

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DER PEROXISOM-PROLIFERATOR-AKTIVIERTE REZEPTOR
GAMMA (PPAR- γ) UND DIE REGULATION DER PRO-
INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINE IM ISCHÄMISCHEN
GEHIRNGEWEBE NACH EINEM SCHLAGANFALL
BEI DER RATTE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

IVONNE STÖCK

aus **Berlin**

Kiel **2010**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Culman, Institut für Experim. u. Klin.
Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel,
den 19.05.2011

gez. Prof. Dr. Robert Stingele

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung	1
1.1 Der ischämische Schlaganfall	1
1.1.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls.....	2
1.1.2 post-ischämische Inflammation.....	3
1.1.3 Apoptose nach einer Ischämie.....	4
1.2 Zytokine	4
1.2.1 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	5
1.2.2 Interleukin-1 (IL-1)	6
1.2.3 Interleukin-6	7
1.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR- γ)	8
1.3.1 Neuroprotektive Wirkung von PPAR- γ	8
1.3.2 Liganden von PPAR- γ	9
1.3.3 Pioglitazon.....	9
1.3.4 Wirkungsweise der Thiazolidinedione.....	10
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Ansetzen von Lösungen	12
2.2 Tiere	14
2.3 Operationstechniken.....	14
2.3.1 Implantation osmotischer Minipumpen	14
2.3.2 Implantation des Femoralkatheters für Blutentnahmen	15
2.3.3 Messung der Hirndurchblutung.....	15
2.3.4 Ablauf der fokalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion.....	15
2.4 Quantifizierung des neurologischen Defizits	16
Skala nach Garcia et al. (1995)	16
2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	18
2.5.1 Bearbeitung der Rattengehirne.....	18
2.5.2 Western-Blot-Analyse	19
2.5.2.1 Proteinisolierung	19
2.5.2.2 Messung des Proteingehalts	19
2.5.2.3 Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS)	20
2.5.2.4 Western-Blot	20
2.5.2.5 Stripping der Western-Blot-Membran	21
2.5.3 Gehirnschnitte	22
2.5.4 Bestimmung des Infarkt Volumens.....	22
2.5.5 Immunhistochemie	23
2.5.6 Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	24
2.6. Verwendete Antikörper	25
2.7 Protokolle der Experimente.....	25
2.7.1 Protokoll 1: Auswirkung der icv Vorbehandlung mit Pioglitazon auf die Blutparameter während der Gehirnischämie.....	26
2.7.2 Protokoll 2: Auswirkung der icv Vorbehandlung mit Pioglitazon auf die Expression von TNF- α , IL1- β und IL-6 im peri-infarktären Kortex.....	26
2.8 Statistische Analyse.....	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF)	28
3.2 Bestimmung physiologischer Parameter im Blut.....	29

3.3 Neurologische Untersuchungen	30
3.4 Infarktvolumen und Infarktödem	32
3.5 Aktivierung zerebraler PPAR- γ reduziert TNF- α , IL-1 β und IL-6 im frontoparietalen Kortex im peri-infarktären Bereich	33
3.5.1 TNF- α -Expression nach zerebraler Ischämie und der Effekt von Pioglitazon.....	33
3.5.2 IL-1 β -Expression nach zerebraler Ischämie.....	36
3.5.3 IL-6-Expression nach zerebraler Ischämie.....	39
4 Diskussion	43
4.1 Intrazerebroventrikuläre Behandlung mit Pioglitazon	43
4.2 Zerebrale PPAR- γ und Neuroprotektion	45
4.3 Post-ischämische Inflammation: Die Rolle der Zytokine	46
4.4 Pioglitazon und TNF- α nach einem ischämischen Schlaganfall.....	47
4.5 Pioglitazon und IL-1 β nach einem ischämischen Schlaganfall.....	48
4.6 Pioglitazon und IL-6 nach einem ischämischen Schlaganfall.....	49
5 Zusammenfassung	52
6 Referenzen/Literatur.....	54
7 Danksagung	60
8 Lebenslauf	61
9 Publikationen.....	62

Abkürzungen

Acc	Arteria carotis communis
Ace	Arteria carotis externa
Aci	Arteria carotis interna
Acm	Arteria cerebri media
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-14-isoxazolepropionic-acid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BS	Blockingsolution/Blocklösung
CBF	zerebraler Blutfluss
CNS	Zentrales Nervensystem
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRF	Corticotropin-Releasing-Faktor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DLB	Denaturing Lysis Buffer
EC	Endothelzellen
ECL	enhanced chemiluminescence
icv	intrazerebroventrikulär
IL-1	Interleukin-1
IL-1RAcP	Interleukin-1-Rezeptor akzessorisches Protein
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JAK	Januskinase
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media
NeuN	neuronales Kernprotein (mouse anti-mouse)
NF- κ B	nuklearer Transkriptionsfaktor κ B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSARs	nichtsteroidalen Antirheumatika
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
pCO ₂	CO ₂ - Partialdruck,
pO ₂	O ₂ - Partialdruck
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PPRE	PPAR- γ -response element
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVDF	Polyvenyldifluorid
rCBF	regionale zerebrale Durchblutung
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
RXR	Retinoid X- Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TZD	Thiazolidinedione
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (auch Trometamol genannt)
15-d-PGJ ₂	15-desoxy-A12,14-Prostaglandin J ₂

1 Einleitung

Der Schlaganfall (Apoplexia cerebri) zählt in den Industrieländern zu einer der häufigsten und bedeutendsten vaskulären Erkrankungen, die zum Tod führen können. Er ist der häufigste Grund für eine dauerhafte Behinderung bei Erwachsenen. Allein in Deutschland erleiden jährlich etwa 350.000 Personen einen Schlaganfall und etwa 70.000 von denen sind danach auf einen Rollstuhl angewiesen oder haben eine andere Behinderung. Nur etwa 40 % der Überlebenden weisen ein Jahr nach der Erkrankung keine Einschränkungen im alltäglichen Leben auf. Er gehört zu den Hauptgründen für Invalidität im höheren Lebensalter. Mit einer Letalitätsrate von 20% steht er in der Todesursachenstatistik an der dritten Stelle hinter koronaren Herzerkrankungen und Tumorerkrankungen.

Je nach Ursache teilt man Schlaganfälle in unterschiedliche Erkrankungsformen ein. Zu etwa 85% gibt es den ischämischen Infarkt, der durch den Verschluss eines Gefäßes oder durch Verschleppung eines Blutgerinnsels in die Gehirngefäße entsteht und zu etwa 15% gibt es den hämorrhagischen Infarkt, der durch eine Hirnblutung entsteht.

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es zum Auftreten eines fokalen neurologischen Defizits, ausgelöst durch eine akute regionale Durchblutungsstörung. Zu einem Verschluss eines Hirngefäßes kann es durch ortständiges thrombotisches Material oder durch einen verschleppten Embolus kommen. Dadurch wird im ischämischen Gewebe eine Kettenreaktion von elektrischen Aktivitäten und biochemischen Reaktionen ausgelöst. Das führt wiederum zu irreversiblen Schäden und neuronalem Zelltod. Dafür reicht eine kurze Unterbindung bzw. Reduzierung des zerebralen Blutflusses unter 20% aus (Hamann et al. 1997).

In experimentellen Studien konnten zwei Schwellenwerte bei einer verminderten Durchblutung des Gehirns festgelegt werden, die helfen das Ausbreitungsgebiet des Schlaganfalls in zwei Areale einzuteilen. Bei einem Abfall des zerebralen Blutflusses (CBF) auf etwa 40 % des Ausgangswertes kommt es zum elektrischen Funktionsausfall der betroffenen Nervenzellen und deren anschließender Erholung. Bei einem Abfall auf 20% des Ausgangswertes entsteht der so genannte ischämische Kern eines Schlaganfalls, in welchem

die Neurone schnell absterben.

Um dieses Gebiet herum liegt die Penumbra (Randzone oder auch ischämischer Halbschatten genannt), in der die Nervenzellen länger überleben bevor auch sie zugrunde gehen, da hier die Zellen zusätzlich von Kollateralgefäßen versorgt werden. In dieser Zone liegt der CBF-Abfall zwischen den Schwellenwerten von 20 % und 40 %. Die Penumbra ist gekennzeichnet durch die erloschene elektrische Aktivität, jedoch ohne strukturelle Schäden. Daraus ergibt sich, dass dieses Gewebe potentiell gerettet werden könnte.

Bei der Behandlung sind zum einen die akute Vorgehensweise und zum anderen die neuroprotektive Therapie entscheidend. Durch diese Maßnahmen kann die Ausbreitung eines neurologischen Schadens innerhalb von 3 h durch die Thrombolyse stationär eingeschränkt werden. Diese Behandlung muss somit so früh wie möglich begonnen werden. Zu der Akuttherapie gehören die rekanalisierenden Maßnahmen, die Aufrechterhaltung der respiratorischen und kardialen Funktionen, der Ausgleich des Elektrolythaushaltes und die Behandlung erhöhter Körpertemperatur und Hyperglykämie.

Bei der Therapie von Schlaganfällen verfolgt man somit nachstehende Ziele:

1. Die Aufrechterhaltung bzw. die Verbesserung der zerebralen Durchblutung
2. Zytoprotektion und Schutz der Nervenzellen vor der Ischämie
3. Vermeidung von sekundären Schäden
4. Schnellstmögliche Einleitung regenerativer Prozesse

1.1.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Durch die Unterbrechung der Substrat- und Sauerstoffzufuhr entsteht ein ATP-Mangel, der aufgrund von minimalen zellulären Reserven nach etwa 15 s zu einer Energieknappheit führt. Folglich kommt es zu einer Reduzierung des Membranpotentials der Gliazellen und Neuronen, wodurch präsynaptische spannungsabhängige Ca-Kanäle aktiviert werden und eine Depolarisation und Freisetzung von Glutamat sowie einiger anderer Neurotransmitter ausgelöst wird. Eine Wiederaufnahme des Glutamats in die präsynaptischen Nervenendigungen ist aufgrund der unzureichenden Energie nicht möglich (Dirnagl et al. 1999). Das Glutamat verbleibt daraufhin im synaptischen Spalt und bewirkt eine andauernde Aktivierung der AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) und NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren. Die Stimulation der NMDA- Rezeptoren führt zu einem erhöhten Einstrom von Ca^{2+} -, Na^{+} -, und Cl^{-} - Ionen und folglich zu einer Wassereinlagerung im Zellinneren der neuronalen Zellen. Die sich daraus ergebende Zellschwellung macht sich

als Hirnödemen bemerkbar.

Im Kerngebiet selbst kommt es schon innerhalb weniger Minuten zu irreversiblen Zellschäden, die durch Proteolyse, Lipolyse und Zerlegung von Mikrotubuli zum Zelltod führen. Der Zusammenbruch der Ionen-Homöostase verursacht innerhalb von Minuten den Tod der Neurone (Dirnagl et al. 1999, Lee et al. 2000). Der Infarkt kann in der Penumbra nur teilweise den CBF vermindern. Es kommt dort nicht vollständig zum Verlust der ATP-Gewinnung, so dass die Neurone mehrere Stunden und sogar wenige Tage überleben können. Jedoch können die Zellen auch bei einer kontinuierlichen Depolarisation später absterben. Einer der Hauptgründe dafür ist eine übermäßige Aktivierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Dadurch kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration und somit zur Depolarisation. Eine wiederkehrende Depolarisation (Peri-Infarkt-Depolarisation) und anschließende Repolarisation der Nervenzellen führt zu einem stark erhöhten Energiebedarf, der nur durch Steigerung der oxidativen Glukoseverstoffwechselung gedeckt werden kann. Da jedoch bei der fokalen Ischämie die Durchblutung und somit auch die Sauerstoff- und Glukosezufuhr gestört sind, führen diese wiederholten Depolarisationen zu einem Energiemangel. Dieses Defizit kann nicht ausgeglichen werden und die Neurone sterben ab, da sie ihr Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten können. Das wiederum verursacht eine Ausbreitung des Infarktvolumens.

1.1.2 post-ischämische Inflammation

Die Stunden und Tage später eintretende post-ischämische Entzündung ist wesentlich an dem Absterben der Neurone in der Penumbra beteiligt. Die Entzündungsreaktionen verschlimmern die Auswirkungen der Ischämie beträchtlich und tragen zum Tod der Neurone bei (Iadecola und Alexander 2001).

Als eine der frühesten Reaktionen nach einem Schlaganfall werden in den ersten Stunden proinflammatorische Zytokine exprimiert, wie z.B. der nukleare Transkriptionsfaktor κB (NF- κB) und die Entzündungsmediatoren, wie z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6).

Im umliegenden Gewebe exprimieren die Endothelzellen (EC) vermehrt Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche. Dadurch kommt es zur Anhäufung von Leukozyten und Makrophagen und zu deren Migration in das beschädigte Nervengewebe (Pantoni et al. 1998, Mabuchi et al. 2000). Die freigesetzten Zytokine führen zur Aktivierung der Mikrogliazellen. Diese lösen dann zusammen mit den Leukozyten und Makrophagen eine starke post-ischämische

Inflammation in der Penumbra aus. Die Akkumulation und Aktivierung von Entzündungszellen sind entscheidend für die Entwicklung des Schlaganfalls.

Zusätzlich zu den Zytokinen wird die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) von den Entzündungszellen exprimiert, die zu einer gesteigerten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) führt und folglich die Bildung von Peroxynitriten bewirkt. Es kommt zu einer Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2). COX-2 und die Mitochondrien-Fehlfunktion trägt zur Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und Prostaglandinen bei. Die ROS wie Peroxynitrite und Superoxide schädigen die Zellmembranen und bewirken die Zerstörung der Mitochondrien. Diese Prozesse führen zur Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Dirnagl et al. 1999, Iadecola und Alexander 2001).

1.1.3 Apoptose nach einer Ischämie

Ob die Zelle durch Apoptose oder Nekrose abstirbt, ist vom Ausmaß der Exzitotoxizität abhängig (Choi 1996, Dirnagl et al. 1999, Lee et al. 2000). Die Zellnekrose der Neurone entsteht durch plötzlichen Mangel an Energie, wodurch ein Anschwellen der Neurone und deren Lyse resultieren. Im Gegensatz zur Nekrose führt bei der Apoptose die Zelle ihren Tod selbst aktiv herbei und dieses gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zu Grunde geht. Dieser Prozess ist energieabhängig.

Durch die Mangel durchblutung kommt es zu einer Hypoxie und die Apoptose wird durch oxidativen Stress, wiederholte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren mit Ca^{2+} -Überladung ausgelöst. Als Folge daraus wird eine Kaskade von spezifischen Proteasen (den Caspasen) stimuliert, wobei die Caspase 3 eine zentrale Rolle in Form einer Effektorcaspase spielt, da sie eine Fragmentierung der DNA einleitet und somit zum Zelltod führt. (Dirnagl et al. 1999, Mattson et al. 2000).

1.2 Zytokine

Die Zytokine (Tumornekrosefaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine) gehören zu den Entzündungsmediatoren. Es handelt sich um Proteine, die von Immunzellen, aber auch von anderen Zellen produziert werden. Durch diese Botenstoffe, die stimulierend oder hemmend auf das Immunsystem wirken, verständigen und koordinieren sich die Immunzellen

und steuern so die Abwehrreaktionen. TNF- α , IL-1 und IL-6 zählen zu den wichtigsten entzündungsfördernden Zytokinen. Ihre Konzentration steigt nach einer Verletzung oder Infektion des Gehirns an (Rothwell et al. 1997). In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass nach einer Ischämie die gesteigerte Expression dieser Zytokine eine entscheidende Rolle im Ausmaß der post-ischämischen Gehirnschäden spielt (Buttini et al. 1994).

1.2.1 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

TNF- α gehört zu den multifunktionalen Zytokinen. Die Produktion von TNF- α findet im Zentralen Nervensystem (ZNS) statt, als Folge einer Infektion, Gehirnverletzung oder Ischämie (Feuerstein et al. 1994). Zum größten Teil wird TNF- α im Gehirn durch Makrophagen gebildet und freigesetzt, aber teilweise wird es auch aus Lymphozyten, Endothelzellen und Neuronen sezerniert. Lipopolysaccharide und Interleukine führen ebenfalls zur erhöhten Expression von TNF- α .

TNF- α aktiviert zwei spezifische Rezeptoren: p55 den TNF-Rezeptor-1 (TNF-R1) und p75 den TNF-Rezeptor-2 (TNF-R2). Der größte Teil der TNF-Aktivität wird jedoch über p55 übermittelt. Beide Rezeptoren aktivieren den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B, wodurch es zur Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung des programmierten Zelltodes kommt.

Durch die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren werden die Proteinkinase C, die Tyrosinkinase, die mitogen-aktivierte Proteinkinase, die Phospholipase A2 und die phosphatdylcholine-spezifische Phospholipase C aktiviert. Es folgt die intrazelluläre Aktivierung von weiteren Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B. Daraufhin wandert NF- κ B vom Zytoplasma zum Zellkern, wo es den Promoter der Gene für Adhäsionsmoleküle und anderer Zytokine aktiviert.

TNF- α kann sowohl die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation und die Freisetzung anderer Zytokine, wie z. B. IL-1 und IL-6 auslösen. Es bewirkt die Expression von Adhäsionsmolekülen in EC, wodurch die neutrophilen Granulozyten zur Migration angeregt werden und im Gewebe akkumulieren. Außerdem ist es an der Aktivierung von Gliazellen beteiligt (Feuerstein et al. 1994, Liu et al. 1994).

Die Erhöhung von TNF- α wurde in zerebralen Ischämien durch einen gesteigerten Spiegel von TNF- α -mRNA im Parenchym nachgewiesen.

Die Konzentration von TNF- α -mRNA steigt sehr schnell nach einer Ischämie an. Schon nach einer Stunde ist die erhöhte TNF- α -mRNA-Expression in Rattengehirnen nachweisbar. Das

Maximum ist nach etwa 6 - 12 h erreicht und der erhöhte TNF- α -mRNA-Spiegel bleibt noch zwei bis fünf Tage nach einer permanenten bzw. nach einer temporären (Liu et al. 1994, Wang et al. 1994) Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) erhöht.

1.2.2 Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 lässt sich in zwei Isoformen α und β unterteilen, welche mit ihrem kompetitiven Rezeptorantagonisten IL-1ra die IL-1 Familie bilden (Rothwell et al. 1997). IL-1ra bindet an der Zelloberfläche an den gleichen Rezeptoren wie IL-1 und hemmt den Rezeptor, wodurch die Wirkung von IL-1 unterdrückt wird.

Die Bildung von IL-1 findet v.a. in Makrophagen bzw. Monozyten, Lymphozyten aber auch in EC statt. In EC führt IL-1 β zur Expression von Adhäsionsmolekülen. Dadurch können die Leukozyten dann in das geschädigte Gewebe migrieren.

IL-1 interagiert mit zwei Rezeptoren, IL-1R1 und IL-1R2. Jedoch nur IL-1R1 ist an der Signaltransduktion beteiligt. Die Bindung von IL-1 an IL-1R1 bewirkt eine inflammatorische Antwort. Durch IL-1R1 wird intrazellulär eine komplexe Signalkaskade eingeleitet, wodurch NF- κ B aktiviert wird. Der Rezeptor verbindet sich mit dem Interleukin-1-Rezeptor-assessorischen Protein (IL-1RAcP) und dem Myd88 Protein und aktiviert dadurch die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 und 2, die über den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor und die NF- κ B induzierende Kinase verschiedene andere Kinasen aktiviert. Die mitogenaktivierte Proteinkinase und die c-Jun N-terminale Kinase 1 unterstützen die durch IL-1 vermittelte Signaltransduktion (Rothwell und Luheshi 2000). IL-1R1 wird zentral in Mikroglia, aber auch von Gliazellen und EC exprimiert. Durch das Inaktivieren IL-1R1 senkt sich das Ausmaß der post-ischämischen Gehirnschäden und der neurologischen Defizite. Die Bindung an IL-1R2 löst keine Signaltransduktionskaskade aus (Rothwell et al. 1999).

Im zentralen Nervensystem ist die Wirkung von IL-1 noch nicht vollständig geklärt und scheint im gesunden Gehirn nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Jedoch bei den pathologischen Vorgängen im Gehirn wird es vermehrt exprimiert und ist an vaskulären Schäden, lokalen Ödemen, der Aktivierung der Glia und der Produktion von NO und freien Radikalen beteiligt. Außerdem bewirkt es die Induktion von COX-2, der Phospholipase A2, den Wachstumsfaktoren und den Adhäsionsmolekülen. Im Hypothalamus (dem Hauptwirkort von IL-1) induziert es Fieber und die Expression des Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF). Dadurch hat IL-1 Einfluss auf die ACTH- und Glucocorticoid-Freisetzung und den Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebennieren (Rothwell et al. 1999).

IL-1 wirkt nicht allein neurotoxisch. Es wirkt jedoch verstärkend auf neurodegenerative Prozesse. Das zeigt sich anhand des erhöhten IL-1-Angebots im ischämischen Gehirn. Nach einer traumatisch bedingten Verletzung des Gehirns oder nach einer zerebralen Ischämie erhöht sich die IL-1 β -mRNA-Konzentration innerhalb von 15–30 min und 2 - 3 h später ist der Proteingehalt auch erhöht (Buttini et al. 1994).

1.2.3 Interleukin-6

Dieses Interleukin wird vor allem von T-Zellen und Makrophagen sezerniert. Für IL-6 gibt es zwei Rezeptortypen. Der membranständige IL-6-Rezeptor befindet sich z.B. auf Leukozyten und leitet seine Signale mit einem rezeptorassoziierten signaltransduzierenden Glykoprotein weiter. Der andere IL-6-Rezeptor ist ein löslicher (IL-6R) und bildet mit IL-6 einen Komplex, der an das Glykoprotein (gp130) der Zellmembran bindet und es aktiviert (IL-6-transsignalling).

Durch Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung des Glykoproteins und die Januskinase (JAK). Daraufhin wird eine Phosphorylierung des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) bewirkt, wodurch die JAK-STAT-Signalwege und die MAP-Kinase-Wege aktiviert werden, welche dann zur Transkription bestimmter Zielgene in dem Zellkern führen. Der JAK-STAT-Signalweg ist ein Signalübertragungsmechanismus, der zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase beiträgt und der entscheidend für die Neuroprotektion und die Schädigung der Neurone ist (Yamashita et al. 2005, Satriotomo et al. 2006).

IL-6 reguliert die Immunantwort nach akuter und chronischer Entzündung. Bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie steigt die IL-6-Konzentration im peripheren Blut (Kim et al. 1996). Dieses Interleukin führt u. a. zur Verschlimmerung neuronaler Schäden und induziert den neuronalen Zelltod. Eine stark erhöhte Konzentration von IL-6 in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Plasma korreliert mit einem größeren Infarktareal und einem schlechteren klinischen Ausgang (Beamer et al. 1995). IL-6 kann auch anti-inflammatorisch wirken, denn durch die Unterdrückung der IL-1- und TNF- α -Bildung hat IL-6 über negative Rückkopplungsmechanismen anti-inflammatorische Auswirkungen. Es fördert die Entstehung der zirkulierenden Antagonisten von IL-1 und TNF- α .

1.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR- γ)

Dieser Zellkern-Rezeptor gehört zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und ist an der Regulation der Genexpression beteiligt, die für den Fett- und Kohlenhydrat-stoffwechsel von Bedeutung sind. Von PPAR sind 3 Subtypen (PPAR- α , PPAR- β und PPAR- γ) bekannt. Es gibt im menschlichen Organismus drei Isoformen von PPAR- γ (PPAR- γ 1, 2 und 3). Am häufigsten findet man PPAR- γ 1 vor. Das Fettgewebe macht mit einer höheren Rate von PPAR- γ 2 eine Ausnahme und PPAR- γ 3 ist ausschließlich im Kolonepithel und im Fettgewebe vorhanden.

PPAR- γ liegt in einer Heterodimerform vor, welche sich aus zwei nukleären Faktoren dem PPAR- γ und dem Retinoid X Rezeptor (RXR) zusammensetzt und für weitere Signaltransduktionen sorgt.

1.3.1 Neuroprotektive Wirkung von PPAR- γ

PPAR- γ lässt sich im ZNS in Neuronen, Mirkroglia, Astrozyten und den versorgenden Blutgefäßen nachweisen. Es besteht aus einer DNA-terminalen Ligandenbindungsdomäne, einer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne, einer Domäne für den Ko-faktor und einer N-terminalen Domäne. Die C-terminale Domäne ist für die Ligandenspezifität verantwortlich und die N- terminale Domäne für die Aktivität von PPAR- γ . Durch die Bindung der Liganden kommt es zur Aktivierung und Konformationsänderung in der Ko-Aktivator-domäne des Rezeptors, wodurch es zur Dissoziation von inhibitorischen Proteinen (Ko-Repressoren) kommt. Daraufhin wandert der Rezeptor aus dem Zytosol in den Zellkern. Im Zellkern bindet der PPAR- γ an das PPAR- γ -response element (PPRE), eine bestimmte Bindungsstelle der DNA, wodurch die Transkription reguliert wird.

PPAR- γ stimuliert die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen und greift in den Fettstoffwechsel ein (Desvergne und Wahli 1999). Es wurde gezeigt, dass die PPAR- γ protektive Effekte auf die Gefäßwände haben und die Entstehung von Arteriosklerose verringern. In den Monozyten wird die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine gesenkt und die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen wird verhindert.

Besonders interessant ist die Wirkung des Rezeptors bei pathologischen Veränderungen des Gehirns im Zusammenhang mit akuten und chronischen neurodegenerativen Prozessen sowie Schlaganfällen. Die PPAR- γ -Expression im Gehirn ist nach fokaler zerebraler Ischämie

erhöht. Die höchste Konzentration wird 24 h nach dem ischämischen Insult erreicht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung von PPAR- γ eine signifikante Verminderung des Schlaganfallvolumens und eine Verbesserung der neurologischen Schäden bewirkt (Zhao et al. 2005, Zhao et al. 2006, Lin et al. 2006, Ou et al. 2006, Patzer et al. 2008).

Bei Aktivierung von PPAR- γ wird der oxidative Stress im ischämischen Bereich verringert. Hinzu kommt eine verminderte Produktion von COX-2 und eine verringerte Aktivierung der iNOS (Zhao et al. 2006).

PPAR- γ hat zusätzlich noch entzündungshemmende Funktionen. Es vermindert die Bildung von inflammatorischen Zytokinen (wie TNF-, IL-6, IL-1 β), von Adhäsionsmolekülen und der Matrix-Metalloproteinase-9. Durch die Hemmung der Entzündungsfaktoren und die Unterdrückung von oxidativem Stress verringert der PPAR- γ die neuronalen post-ischämischen Defekte.

1.3.2 Liganden von PPAR- γ

An den PPAR- γ binden sowohl natürliche als auch synthetisch hergestellte Liganden. Zu den natürlichen Liganden von PPAR- γ gehören zum Beispiel Eicosanoide (wie 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂)), oxidierte Linolsäureprodukte und Fettsäuren (wie Arachidonsäure). Synthetische Liganden sind die Thiazolidinedione (TZD) so genannte Insulinsensitizer und die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSARs) (wie z.B. Indomethacin, Ibuprofen und Naproxen).

1.3.3 Pioglitazon

Pioglitazon gehört wie Rosiglitazon zu den Insulinsensitizern (Glitazonen) und somit zur Wirkstoffgruppe der Thiazolidinedione, die ihr eigentliches klinisches Einsatzgebiet in der Diabetes mellitus Typ 2 -Behandlung haben, vor allem in einer Kombinationstherapie mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen.

1.3.4 Wirkungsweise der Thiazolidinedione

Die Thiazolidinedione aktivieren die PPAR- γ im Zellkern. Durch seine Stimulierung steigt die Sensitivität der Zellen von Leber, Muskulatur und Fettgewebe für Insulin, wodurch das körpereigene Insulin wieder in der Lage ist erhöhte Blutzuckerspiegel zu senken.

Der Blutzuckerspiegel sinkt sowohl in nüchternem Zustand als auch nach den Mahlzeiten. Auch die nüchtern und postprandial gemessenen Plasmainsulinkonzentrationen fallen unter TZD-Einnahme ab sowie der Langzeitblutzuckerwert HbA1c. Pioglitazon führt zu einer besseren Wirkung des körpereigenen Insulins sowie des zugeführten Insulins.

Außerdem verhindern die TZD die Expression von Chemokinen und pro-inflammatorischen Zytokinen in menschlichen T-Zellen, die Ausscheidung von matrixdegradierenden Enzymen in Makrophagen, die Aktivierung von Monozyten, T-Zellen und Leukozyten in den Gefäßwänden.

Die TZD wirken deshalb entzündungshemmend und anti-atherogen, indem sie nach der Bindung an den PPAR- γ die Gentranskription verhindern (z.B. bei der Expressions-Unterdrückung von TNF- α). Außerdem werden die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Monozyten an aktivierten EC unterdrückt. Zum Teil werden die anti-phlogistischen Wirkungen über den PPAR- γ -Weg zur Deaktivierung von NF- κ B nur den synthetisch hergestellten Agonisten unterstellt (Desvergne und Wahli 1999).

Alle diese Daten erregen den Anschein, dass die Liganden von PPAR- γ eine große Bedeutung in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalles haben können und dass die Aktivierung von PPAR- γ -Rezeptoren sich vorteilhaft während und nach einem Schlaganfall auswirkt.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine systemische oder zentrale, d. h. intrazerebroventrikuläre (icv) Vorbehandlung mit PPAR- γ -Agonisten neuroprotektive Wirkungen bei der experimentellen fokalen Ischämie beim Tier aufweisen. Einer der Mechanismen der neuroprotektiven Wirkungen ist die Unterdrückung der post-ischämischen Inflammation im Gewebe am Rande des ischämischen Kerns, in der Penumbra. Die Überladung der geschädigten Neurone mit Calcium während der peri-infarktären Depolarisation führt zur Exzitotoxizität und die freien Sauerstoffradikale aktivieren die pro-inflammatorischen Gene in geschädigten Neuronen. Die Neurone und die aktivierte Mikroglia produzieren pro-inflammatorische Zytokine, welche bei der Auslösung und Aufrechterhaltung der post-ischämischen Inflammation und der nachfolgenden Apoptose eine entscheidende Rolle spielen. Zu den wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokinen gehören TNF- α , IL-1 β und IL-6. Die erhöhte Expression dieser Zytokine im ischämischen Hirngewebe bewirkt die Transkription und die Expression zahlreicher inflammatorischer Mediatoren und neurotoxischer Stoffe, welche für den fortschreitenden Schaden und den neuronalen Zelltod verantwortlich sind. Eine veränderte Expression dieser Zytokine unter der PPAR- γ -Aktivierung kann zu den neuroprotektiven Effekten von Pioglitazon beitragen. Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung von zentralen PPAR- γ -Rezeptoren für die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 im ischämischen neuronalen Gewebe nach einer fokalen zerebralen Ischämie zu untersuchen.

Um eine effektive Stimulation der zentralen PPAR- γ -Rezeptoren zu erzielen, wurde bei normotensiven Wistar Ratten mittels osmotischer Minipumpen fünf Tage lang der selektive PPAR- γ -Agonist Pioglitazon icv (3 nmol/h) infundiert. Die Kontrollgruppe wurde mit Vehikel behandelt. Zur Induktion der temporären fokalen zerebralen Ischämie wurde die rechte Arteria cerebri media (Acm) der Tiere verschlossen und nach 90 min wieder eröffnet. Der neurologische Status wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen ermittelt, um eine zeitliche Entwicklung während der akuten Phase nach dem ischämischen Insult zu erfassen. Der ischämische frontoparietale Kortex am Rande des ischämischen Kerns wurde 24 h bzw. 48 h nach der Induktion der Ischämie entnommen. In diesem Gewebe wurde die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 mittels der Western-Blot-Analyse quantifiziert. Die Anzahl und der Typ der Zellen, welche diese Zytokine exprimieren, wurden mittels der immunhistochemischen Untersuchungen und der Immunfluoreszenzfärbungen an Gehirnschnitten bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Ansetzen von Lösungen

4% Chloralhydrat-Lösung (400 mg/kg): 4 g Chloralhydrat wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

Phosphatpuffer (PB) pH 7,4: 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, dann der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und schließlich mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

10 x PBS Kochsalzlösung gepuffert mit Phosphat (PBS) pH 7,4: 80 g NaCl, 11,5 g Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, dann der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung verwendet (1 x PBS).

PBST: Zu 100 ml 10 x PBS wurden 3 ml Triton X-100 hinzugefügt und auf 1 l destilliertes Wasser aufgefüllt.

30 %-ige Glucose-Lösung: 150 g Glucose wurden in 300 ml PBS gelöst (1 x, pH 7,4), dann wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 500 ml erhöht.

4 % Paraformaldehyd-Lösung: 40 g Paraformaldehyd wurden bei 60° C in 900 ml PBS gelöst und dann wurde das Volumen auf 1000 ml mit destilliertem Wasser eingestellt.

denaturierender Lysepuffer (DLB): 2 ml destilliertes Wasser wurden mit 2 ml DLB, mit 400 µl Complete Inhibitor (Roche, Mannheim), mit 40 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma-Aldrich, München) und mit 8 µl Nonident vermischt.

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA): Der Albumin Standard mit einer Albumin-Konzentration von 2 mg/ml in NaCl wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, so dass Standardlösungen der Konzentration 0, 25, 50, 125, 250, 500 und 1000 µg/ml entstanden. Die Reaktionslösung wurde aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 kurz vor dem Gebrauch hergestellt.

4 x Trenngelpuffer: 150 ml 2 M Trishydroxymethylaminomethan mit einem pH-Wert von 8,8 (36,34g Tris in 150 ml destilliertem Wasser), 8 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung (10 g SDS in 100 ml destilliertem Wasser) und 42 ml bidestilliertes Wasser wurden dafür zusammengefügt und vermischt.

4 x Sammelgelpuffer: Verwendet wurden 100 ml 1M Tris mit einem pH-Wert von 6,8 (12,1 g Tris in 100 ml destilliertem Wasser), 8 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung und 92 ml bidestilliertes Wasser.

10 x Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 144 g Glycin und 100 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung wurden bis zu einem Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt (pH ~ 8,3). Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung hergestellt.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung: Verwendet wurden die 40 %-ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (39:1) der Firma Bio Rad Laboratories (München).

5 x Probenpuffer: 0,6 ml 1M Tris (mit einem pH-Wert von 6,8), 5 ml einer 50 %-igen Glycerol-lösung (50 ml Glycerol plus 50 ml destilliertes Wasser), 2 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung, 0,5 ml β -Mercaptoethanol und 1 ml einer 1 %-igen Bromphenolblau-Lösung wurden miteinander vermischt.

Trenngel (12 % für 1,5 mm Plattenabstand): 3,0 ml der Acrylamidlösung, 4,5 ml destilliertes Wasser und 2,5 ml des 4 x Trenngelpuffers wurden gemischt. Zur Einleitung der Polymerisation wurden 10 μ l Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Katalysator 100 μ l einer 10 %-igen Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) zugesetzt.

Sammelgel (12 % für 1,5 mm Plattenabstand): 0,5 ml Acrylamid-Lösung, 2,47 ml destilliertes Wasser und 1 ml 4 x Sammelgelpuffer wurden gemischt. Beim Sammelgel wurden 5 μ l TEMED und 30 μ l der APS-Lösung zugesetzt.

Markerlösung: Als Proteinmolekulargewichtsmarker wurde ein Breitband-Proteinmarker (2-212 kDa) der Firma New England Bio Labs (Frankfurt a. M.) verwendet.

Proteinleiter: Zur Markierung des Proteingewichts auf dem Film wurde ein biotinierter Proteinleiter (Cell Signal, Frankfurt a. M.) verwendet.

12% SDS-PAGE Separating Gel: Für 1 Gel wurden 2 ml 30 %-iges Acrylamid, 1,75 ml destilliertes Wasser, 1,25 ml Puffer, 50 μ l von 10 %-igem APS und 5 μ l TEMED benötigt.

10 x Transferpuffer: 5,82 g Tris, 2,93 g Glycin und 0,375 g SDS wurden bei einem pH-Wert von 9 bis 9,4 mit 250 ml Methanol destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.

10 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung): 60,57 g Tris und 43,83 g NaCl wurden in 500 ml Wasser gelöst (pH-Wert = 7,5).

1 x TTBS (= TBS mit Tween): 900 ml Wasser, 100 ml 10 x TBS und 1 ml Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt) wurden zusammengefügt.

Blocklösung (= 4 %-ige fettfreie Milchpulverlösung): 4 g Magermilchpulver wurden in 100 ml TTBS gelöst.

ECL-Substratlösung: ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Bio-sciences, GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK): Lösung A und B wurden kurz vor dem Gebrauch im Verhältnis 25:1 gemischt.

Stripping-Lösung: 7,57 g Tris wurden in 600 ml destilliertem Wasser gelöst (pH = 6,7) und mit 20 g SDS sowie 14,3 ml β -Mercaptoethanol vermischt. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.

ABC-Lösung: Vectastain Elite ABC Reagenz der Firma Vector Laboratories (Wiesbaden): Zwei Tropfen vom Reagenz A wurden zu 5 ml PBST hinzugefügt. Danach wurden zwei Tropfen von dem Reagenz B hinzugegeben und dann 30 min stehen gelassen.

DAB-Lösung: Kit D 4418 der Firma Sigma (Steinheim): Eine 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid-Tablette (10 mg DAB) und eine Tablette Wasserstoffperoxid wurden in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch zubereitet und im Dunklen aufbewahrt.

3 %-iges Bovines Serum Albumin (BSA): 3 g BSA-Pulver wurden in 100 ml PBST gelöst.

2.2 Tiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld /Deutschland) mit einem Gewicht von etwa 220 bis 250 g bei kontrollierten Bedingungen bezüglich der Temperatur (25° C), der Luftfeuchtigkeit (60%) und des Tag-Nacht-Rhythmus (12/12 h) gehalten. Zum Wasser und zur Nahrung hatten die Ratten freien Zugang. Für alle Operationen wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von 4 %-igem Chloralhydrat (400 mg/kg Körpergewicht; Merck, Darmstadt) narkotisiert.

2.3 Operationstechniken

2.3.1 Implantation osmotischer Minipumpen

Die osmotischen Minipumpen (ALZET ® Typ 2002; Charles River Laboratories, Sulzfeld) zur icv Infusion wurden fünf Tage vor Versuchsbeginn auf dem Rücken der Tiere implantiert. Die Pumpen bestanden aus zwei Kompartimenten. Ein mit hyperosmolarer Lösung gefülltes Kompartiment zog durch eine semipermeable Membran Wasser aus dem umliegenden Gewebe an. Durch den entstandenen Druck wurde 0,5 µl Lösung pro Stunde aus dem zweiten Kompartiment über eine Kanüle in den linken lateralen Ventrikel der Versuchstiere kontinuierlich über 14 Tage infundiert. Diese Minipumpen wurden luftblasenfrei mit Vehikel (50 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in physiologischer Kochsalzlösung) oder Pioglitazon (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA) aufgefüllt. Um eine konstante Fließrate aufzubauen, wurden die osmotischen Pumpen im Inkubator für 24 h bei 37 °C in steriler Kochsalzlösung inkubiert. Zur Implantation der Pumpe wurde ein Polyethylenkatheter (PP-60) mit einer rechtwinkligen Metallkanüle (Größe: 21-Gauge) versehen und in den linken Ventrikel der Rattengehirne eingebracht. Die anästhesierte Ratte wurde dafür in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) fixiert und es wurde 0,6 mm kaudal und 1,3 mm lateral (links) vom Bregma (Kreuzungspunkt der Sutura sagitalis mit der Sutura coronaris) ein Loch gebohrt, in welches dann der kurze Arm der Metallkanüle eingeführt wurde. Die Länge des kurzen Armes entsprach mit 5 mm dem Abstand zwischen der äußeren Schädeloberfläche und dem Seitenventrikel. Um das Ganze zu fixieren, wurde Trimm[®] (zahnmedizinischer Zement) und eine in die Kalotte gedrehte Schraube verwendet. Die Pumpe wurde in einer zuvor unter der Haut präparierten Tasche auf dem Rücken der Ratte implantiert.

2.3.2 Implantation des Femoralkatheters für Blutentnahmen

Zwei Tage vor dem Verschluss der Acm wurde ein Polyethylenkatheter (PP-50) mit Kochsalz-Heparin-Lösung gefüllt. Dieser wurde in die A. femoralis eingeführt. Das andere Ende des Katheters wurde durch einen Tunnel unter der Haut von der Leiste bis hin zum Nacken des Tieres durchgezogen. Im Nacken wurde der Katheter befestigt und das herausschauende Ende zugeschweißt.

2.3.3 Messung der Hirndurchblutung

Zur Kontrolle des Verschlusses der Acm wurde die regionale zerebrale Durchblutung (rCBF) in beiden Hemisphären gemessen (Periflux System 5000). Unter Narkose wurde der Kopf der Ratte in einem stereotaktischen Gerät fixiert (David Kopf Instruments) und ein etwa 1mm großes Loch (5,0 mm lateral der Mittellinie und 1,0 mm kaudal vom Bregma entfernt) gebohrt. Dort wurde eine Plastikhülse platziert und mit Trimm[®] (PMMA) fixiert. Für einen besseren Halt wurde noch im hinteren linken Bereich des Schädels eine Schraube vorsichtig eingedreht (rechtsseitiger Schlaganfall!).

Über die Hülse wurde dann während der Operation der Laser-Doppler-Fluss-Detektor (LDF-Detektor) vorsichtig bis an die intakte Dura mater herangeschoben. Der rCBF wurde nach der Narkose, zu Beginn des Schlaganfalls, 30 und 90 min nach Schlaganfallbeginn sowie 30 min nach Entfernung des Fadens gemessen.

2.3.4 Ablauf der fokalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion

Nach der Anästhesie der Tiere wurde die rechte Arteria carotis communis (Acc) unter dem Operationsmikroskop von den umgebenden Gewebestrukturen freipräpariert und die Arteria carotis externa (Ace) isoliert und ligiert. Daraufhin wurde auch die Arteria carotis interna (Aci) proximal bis zum Canalis carotis an der Schädelbasis isoliert und nach einer kleinen Inzision konnte ein speziell präparierter Faden durch die Acc vorsichtig in die Aci vorgeschoben werden, bis ein Widerstand spürbar wurde (etwa 17 mm von der Karotisbifurkation entfernt). Dieser Faden (4/0, 1,5 Metrik, Monofilament, Ethilon, Ethicon GmbH & Co. KG, Deutschland) wurde zuvor an dem distalen Ende (5 mm) mit einer

Silikonschicht (Provil, Bayer AG, Deutschland) überzogen, um den Durchmesser des Fadens auf 0,25 mm zu erhöhen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Faden soweit vorgeschoben wurde bis der ipsilaterale Blutfluss auf mindestens 25% des Ausgangswertes oder weniger gesunken war. Tiere ohne den gewünschten Abfall des Blutflusses wurden nicht ins Protokoll aufgenommen. Für 90 min wurde der Faden mittels einer Ligatur zum Verschluss der Acm in dieser Position fixiert. Danach wurde der Faden herausgezogen. Die Temperatur der Ratte wurde während der Operation mit Hilfe einer Heizdecke bei 37,0 °C gehalten.

Eine Gruppe der Tiere wurde sham-operiert. Es wurde also keine zerebrale Ischämie induziert, sondern lediglich eine Placebo-Operation durchgeführt. Diese Tiere wurden narkotisiert und die Arterie dargestellt. Nach 90 min wurde die zugeführte Wunde wieder zugenäht.

2.4 Quantifizierung des neurologischen Defizits

Diese Auswertung fand blind statt, d.h. sie wurde von einem Mitarbeiter durchgeführt, der über die jeweilige Behandlung des Tieres nicht informiert war. Es wurde folgende Untersuchungsmethode angewendet.

Skala nach Garcia et al. (1995)

Diese Untersuchungsmethode bestand aus sechs Testverfahren:

1. Spontane Aktivität

Der Käfig mit der Ratte wurde in einen ruhigen Raum gestellt und man wartete bis sich die Ratte akklimatisiert hatte. Dann entfernte man den Deckel des Käfigs und beobachtete die Ratte 5 min lang. Hierbei war es wichtig auf die Aktivität der Ratte und ihre Berührungen mit den Käfigwänden zu achten (v. a. wie viele Wände des Käfigs sie dabei berührte). Die spontane Aktivität wurde in vier Stufen eingeteilt.

Stufe 0: Die Ratte bewegte sich gar nicht. Sie ist durch den Schlaganfall sehr stark beeinträchtigt gewesen.

Stufe 1: Die Ratte bewegte sich kaum, da sie stark beeinträchtigt war.

Stufe 2: Die Ratte bewegte sich, aber näherte sich nicht allen Seiten des Käfigs.

Stufe 3: Die Ratte bewegte sich und erkundete seine Umgebung, wobei sie mindestens drei Wände berührte.

2. Symmetrie bei Bewegung aller vier Gliedmaßen

Für diesen Test wurde die Ratte an ihrem Schwanz in die Luft gehoben. Dabei betrachtete man die Bewegungen ihrer Gliedmaßen. Es gab wieder vier Stufen.

Stufe 0: Die linken Gliedmaßen zeigten keinerlei Bewegungen.

Stufe 1: Die linken Gliedmaßen bewegten sich nur minimal.

Stufe 2: Die linken Gliedmaßen bewegten sich weniger oder langsamer als die auf der rechten Seite.

Stufe 3: Es bestand eine Symmetrie bei der Bewegung aller vier Gliedmaßen.

3. Ausstrecken der Vorderpfoten

Das Tier wurde nun wieder am Schwanz hochgehoben. Diesmal betrachtete man jedoch, wie es auf seinen Vorderpfoten gehen konnte und wie symmetrisch es diese ausstreckte. Eingeteilt wurde dieses Verfahren wieder in vier Stufen.

Stufe 0: Die Ratte konnte die linke Vorderpfote nicht ausstrecken.

Stufe 1: Die Ratte konnte die linke Vorderpfote nur minimal ausstrecken.

Stufe 2: Die linke Seite wurde weniger ausgestreckt als die rechte Seite, wodurch ein ungleiches Gangbild entstand.

Stufe 3: Die Ratte konnte beide Vorderpfoten gleichmäßig ausstrecken und normal gehen.

4. Klettern

Bei diesem Versuch wurde die Ratte auf das Gitter des Käfigs gesetzt. Folgende drei Abstufungen wurden gemacht.

Stufe 1: Die Ratte konnte nicht klettern oder sie bewegte sich im Kreis.

Stufe 2: Sie kletterte vorwiegend mit den rechten Gliedmaßen, da die linken Pfoten nicht so gut greifen konnten. Das Klettern war erschwert.

Stufe 3: Für die Ratte war das Klettern am Gitter problemlos möglich.

5. Propriozeption des Körpers

Die Ratte wurde mit einem Holzstäbchen auf der linken Seite des Körpers berührt und die Reaktionen wurden mit denen an der rechten Körperseite verglichen. Es gab wieder drei Unterteilungen.

Stufe 1: Die Ratte reagierte überhaupt nicht auf den Stimulus.

Stufe 2: Sie reagierte auf der linken Seite schwächer und verzögert.

Stufe 3: Es kam beidseits zu der gleichen Reaktion bei ihrer Berührung.

6. Reaktion bei Berührung der Vibrissae

Diesmal wurden die Vibrissae rechts- und linksseitig mit dem Holzstäbchen berührt. Hierbei war es wichtig, dass sich das Stäbchen von hinten näherte, da die Ratte sonst auf den optischen Reiz reagierte. Dieser Test unterschied drei Stufen.

Stufe 1: Auf der linken Körperseite kam es zu keiner Reaktion.

Stufe 2: Der Reiz führte zu einer schwächeren und verlangsamten Kopfdrehung und Bewegung auf der linken Seite.

Stufe 3: Auf beiden Seiten wurde aufgrund des Stimulus die gleiche Bewegung des Kopfes ausgelöst.

Addiert man nun die einzelnen Punkte, die den verschiedenen Stufen der sechs Tests entsprechen, erhält man den Grad des neurologischen Defizits. Das bedeutet, dass je niedriger die Punktzahl (Minimum 3 - 5 Punkte) ist, umso größer ist die neurologische Beeinträchtigung und je höher die Punktzahl (Maximum 18 Punkte) ist, umso besser ist der neurologische Zustand der Ratte.

2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

2.5.1 Bearbeitung der Rattengehirne

Die Tiere wurden 24 h bzw. 48 h nach dem Schlaganfall mit Chloralhydrat (400 mg/kg Körpergewicht) tief narkotisiert und ihre Brustkörbe sofort eröffnet. Das Herz wurde freigelegt, das rechte Herzohr eingeschnitten und eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Durch eine transkardiale Perfusion mit eiskalter PBS und gefolgt von 4% -haltiger Paraformaldehyd-Lösung wurde das Tier perfundiert. Anschließend wurden die Gehirne dem Schädel entnommen und zur Fixation des Hirngewebes in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung für 24 h eingelagert. Vor dem Einfrieren wurde dem Gewebe in 30 %-iger Glucose-Lösung bei 4 °C für drei bis vier Tage Flüssigkeit entzogen.

Die Gehirne wurden für die Western-Blot-Analyse ohne eine vorherige Perfusion entnommen, um dann Gewebeproben aus dem ischämischen Bereich des rechten frontoparietalen Kortex zu entfernen. Anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren (Abb.: 2.5).

2.5.2.3 Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS)

Um die Proteine mit Hilfe der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molekulargewichte zu trennen, wurde eine Trägermatrix, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit dem Mini-Protean 3 System (Bio-Rad Laboratories, München) hergestellt. Nach dem Zusammenbau der Gelgießkammer wurde das Trenngel nach Zugabe von TEMED und APS-Lösung mit einer Pasteurpipette möglichst luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Vor der Polymerisation wurde ein Kamm in das Sammelgel eingelegt, um die Taschen für die späteren Proben zu formen. Das Gel brauchte 10 - 30 min bis es auspolymerisiert war. Danach wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und das fertige Gel in eine Elektrophoresekammer eingebracht, die zuvor mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde. Der Kamm wurde entfernt und die Probestaschen mit einer Kanüle gespült. Die berechneten Puffermengen (DLB) und Proteinmenge ergeben zusammen 10 µl. Dazu wurden noch 2 µl loading buffer gegeben. Dann wurden noch Marker und Ladder mit der passenden Menge DLB sowie 2 µl loading buffer aufgefüllt. Alle präparierten Elektrophoreseproben wurden dann für 10 min bei 95 °C erhitzt, für 5 min auf Eis gelagert und nochmal leicht zentrifugiert. Anschließend wurden sie auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zuerst wurden die Gele für 5 min an eine Spannung von 200 V angeschlossen und danach für 1,5 bis 2 h an 100 V angeschlossen.

2.5.2.4 Western-Blot

Für die Protein-Bestimmung durch die Western-Blot-Analyse wurde der Elektrobloetter Transblot SD Cell (Bio Rad Laboratories, München) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden pro Blot zwei Whatman-Filterpapiere (Filterpapier 10 x 7 cm: Bio Rad Laboratories, München) und eine PVDF-Blotmembran (10 x 7 cm: Immobilon™ P 1500, Porengröße = 0,45 µm; Millipore, Schwalbach) benutzt. Die Membran wurde für 3 min in konzentriertem Methanol aktiviert und dann in destilliertes Wasser gelegt, bis sie sich abgesenkt hatte. Die Membran und die Filter wurden dann in Transferpuffer eingelegt und kurz gewaschen. Auf den Elektrobloetter wurden ein Filter und darauf die Membran aufgebracht. Das Gel wurde vom Sammelgel getrennt, in Transferpuffer gewaschen und auf die Membran gelegt. Die letzte Schicht bildete der zweite Filter. Beim Blotting wurde nun ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Dadurch wanderten die Proteine in diesem Fall bei konstanten 0,16 A für 65 min aus dem 12 %-igen SDS-Gel auf die Membran

und blieben an der Oberfläche der Membran haften, so dass das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten wurde. Die Filter und das Gel wurden dann von der Membran entfernt und die Membran sowie ihre Banden wurden markiert. Die folgenden Wasch- und Inkubationsvorgänge fanden auf einem Schüttler (CAT RM5 oder ST5, M. Zipperer, Staufien) statt. Die Membran wurde für 20 min in TTBS und für 1 h in Blockpuffer gewaschen und anschließend bei 4 °C mit dem entsprechenden in Blockpuffer gelösten Antikörper einen Tag lang inkubiert. Nach dem Waschen mit TTBS (1 x 15 und 2 x 5 min) wurde die Membran mit dem korrespondierenden zweiten Antikörper und 1 µl Anti-Biotin-konjugierten Antikörper für 1 h inkubiert. Die Membran wurde dann wieder mit TTBS gewaschen (1 x 15 und 4 x 5 min). Die Detektion der Proteinbanden fand dann in einer Dunkelkammer statt. Durch eine Chemolumineszenzlösung wurden die Kodak-Filme belichtet und entwickelt. Zu diesem Zweck wurde die Membran mit den aufgetragenen Proteinen nach oben auf eine feste Plastikfolie gelegt und mit der ECL-Lösung bedeckt. Die überschüssige Lösung wurde nach 3 min abgekippt und die Membran mit einer zweiten Plastikfolie abgedeckt. Die Membran wurde dann mit einem ECL-Film in eine Röntgenkassette für unterschiedliche Zeiträume (1s bis 5 min) eingelegt und exponiert. Der Film wurde anschließend mit dem AGFA Curix 60 Röntgenbildentwickler entwickelt. Die Banden der jeweiligen Transkriptionsfaktoren auf den Filmen wurden eingescannt und anhand der Pixelintensität des Blots mit Hilfe eines Computerprogramms zur Quantifizierung (Quantity One Software, Bio-Rad Laboratories, München) analysiert. Die Werte wurden im Verhältnis zu den Intensitäten der Banden für β -Aktin, einem ubiquitären Zellmarker, gesetzt.

2.5.2.5 Stripping der Western-Blot-Membran

Nach der ersten Färbung konnten durch das Strippen mit einer Strippinglösung, die für 30 min bei 50 °C einwirkte, die Komplexe der Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden und die Membran für weitere Primärantikörper empfänglich gemacht werden. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Membranen für 10 min mit TTBS gewaschen und für 30 - 60 min in Blocklösung inkubiert. Nun konnte die Membran erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

2.5.3 Gehirnschnitte

Im Kryostaten (Leica CM3050 S) wurden bei -20 °C koronale Schnitte vom Bregma + 3,7 mm bis hin zum Bregma - 6,7 mm für die Bestimmung des Infarktvolumens und für die immunhistochemischen (ihc) Untersuchungen geschnitten. Für die Immunfluoreszenzuntersuchung wurden koronare Schnitte von 8 µm Dicke (Bregma - 1,3) angefertigt und anschließend auf Gelantine beschichtete Objektträger aufgebracht. Die 40 µm dicken Schnitte (Bregma ± 0; - 1,3; - 2,3) wurden für die Immunhistochemie in 24-Well-Platten mit 0,2 %-iger Paraformaldehydlösung bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.5.4 Bestimmung des Infarktvolumens

Für die Infarktvolumenbestimmung wurden die 40 µm Schnitte mit Kresylviolett gefärbt. Für die Kresylviolett-Färbung wurden die Gehirnschnitte erstmal für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen, mit 96 %-igem Ethanol dehydriert und für 15 min in Xylol entfärbt. Es folgte die Inkubation für 1 min in 96 %-igem Ethanol und 1 min in destilliertem Wasser mit anschließender Färbung in 0,1 %-iger Kresylviolett-Lösung für 15 min. Daraufhin wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und kurz mit 1 %-iger Essigsäure in Ethanol gespült. Das Infarktgebiet wurde mit Hilfe des Leica Image Analysis Systems (Leica Mikrosystem) bestimmt. Die Schnitte wurden eingescannt, die Grenzen zwischen dem ischämischen Kern und dem umliegenden Gewebe markiert, die Infarktareale ausgemessen und dann das Infarktvolumen aus dem Produkt der Summe des Infarktareals und der Distanz zwischen den einzelnen Schnitten bestimmt. Zusätzlich wurden die ipsi- und die kontralateralen Volumina beider Hemisphären bestimmt und die Differenz zwischen den beiden Zahlen wurde zur Berechnung des Ödemvolumens verwendet. Bei der Berechnung des Infarktvolumens wurde das Ausmaß des Hirnödems berücksichtigt (Korrektur nach Swanson et al. 1990).

2.5.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen basieren auf dem Einsatz von korrespondierenden Primär- und Sekundärantikörpern, die an Enzyme, hier Peroxidasen, gekoppelt sind, welche dann in einer enzymkatalysierten Reaktion aus den farblosen Chromogenen einen Farbstoff bilden können.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die 40 µm dicken Gehirnschnitte in kaltem PBST (3 x 5 min) gewaschen und nach der 5-minütigen Inkubation mit 0,1 %-igem Triton Natriumcitrat wurde die gesamte Flüssigkeit von den Schnitten wieder abgesaugt und ein Gemisch von Methanol und 30 %-igem Wasserstoffperoxid im Verhältnis 100:1 für 10 min eingefüllt (um die endogene Peroxidase abzusättigen) und durch erneutes Waschen mit PBST (2 x 10 min) wieder entfernt. Die Schnitte wurden danach 1 h in Blockpuffer inkubiert, um interferierende Proteine zu blockieren, und anschließend für 10 min in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Nicht gebundene Antikörper wurden durch erneutes Waschen (3 x 10 min) mit PBST entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem geeigneten Biotin-gekoppelten zweiten Antikörper für 45 min bei 37 °C. Durch Inkubation mit dem ABC-Kit (Vectastain Avidin-Biotin Komplex Peroxidase Kit, Vector Laboratories) wurde dann die Avidin-gekoppelte Peroxidase an den zweiten Antikörper gebunden. Die empfindliche Avidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Bindung von enzym-markierenden Avidin-Biotin-Komplexen an biotinierte Sekundärantikörper aus. Das Biotin ist dabei kovalent an den Antikörper gebunden und bei der Reaktion bindet das Avidin der Komplexe an die Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Schnitte wieder mit PBST gewaschen (2 x 5 und 1 x 10 min) und für ca. 20 min in DAB-Lösung (Diaminobenzidin; Stammlosung 5 mg/ml Trizma-Puffer, pH 7,6 bei 26°C) aufbewahrt, was zu der Braunfärbung führte. Die Farbreaktion wurde durch das Zuführen von 0,02 %-igem Wasserstoffperoxid gestartet. Danach wurde alles mit destilliertem Wasser (1 x kurz und 2 x 10 min) gespült.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen, kurz in Xylol getaucht und mit Pertex (Medite, Burgdorf) abgedeckt. Die Anzahl der positiv markierten Zellen wurde mit Hilfe der Leica Image Analysis Software (Leica Qwin) in drei zufällig ausgewählten, sich nicht überschneidenden Bereichen ermittelt.

2.5.6 Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzfärbung bindet ein Antikörper, der so genannte Primärantikörper, an ein Epitop des gesuchten Proteins. Gleichzeitig gibt man einen zweiten Primärantikörper, z.B. gegen einen spezifischen Zellmarker hinzu, der dann die Bestimmung von den entsprechenden Zelltypen möglich macht. In unseren Versuchen wurden neuronal-nuclei (NeuN) Marker für Neurone und CD-68 Marker für aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen verwendet. Anschließend werden Sekundärantikörper, an die Fluorchrom gebunden ist, hinzugefügt und das führt bei entsprechender Anregung zur Fluoreszenz.

Für die Kolokalisationsversuche wurden die 8 µm dicke Schnitte auf Permanox Objektträgern aufgebracht und mit dem DakoPen (DakoCynomation, Glostrup, Dänemark) wurde eine Barriere um die Gehirnschnitte gebildet. Die Schnitte wurden für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Schnitte mit PBST (3 x 5 min) gewaschen. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit 3 %-igem BSA bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (100 µl pro Hirnschnitt) bei 4 °C für 24 h in einer mit feuchtem Papier ausgelegten Plastikkassette.

Nach dem Waschen mit PBST (3 x 5 min) folgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen den jeweiligen Zelltyp bei 4 °C für 4 h in der Plastikkassette.

Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen (3 x 5 min), bei 37 °C für 1 h mit dem korrespondierenden sekundären Antikörper inkubiert und anschließend wieder mit PBST (3 x 5 min) gewaschen und in Dunkelheit bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Gehirnschnitte wurden dann mit Hilfe von jeweils 15 µl Slow Fade® Light Antifade Reagenz (Molekular Probes, Eugene, OR, USA) auf die Objektträger gebracht und in Dunkelheit aufbewahrt.

Mikroskopie:

Für die qualitative Analyse wurde ein Leica DMR Fluoreszenzmikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) verwendet. Alle Bilder wurden mit der AxioCamMRmKamera und dem Adapter TV 1,0 x (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit dem AxioVision 4.5 Programm (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

2.6. Verwendete Antikörper

Antikörper für Western Blot:

	1. Antikörper	2. Antikörper
TNF- α	1:1000; 4% BS; rabbit	1:3000; 4% BS; anti-rabbit
IL1- β	1:3000; 4% BS; rabbit	1:3000; 4% BS; anti-rabbit
IL-6	1:300; 4% BS; goat	1:10000; 4% BS; anti-goat
β -Aktin	1:8000; 4% BS; mouse	1:8000; 4% BS; anti-mouse

Antikörper für Immunhistochemie:

	1. Antikörper	2. Antikörper
TNF- α	1:500; rabbit	KIT; anti-rabbit
IL1- β	1:300; rabbit	KIT; anti-rabbit
IL-6	1:50; goat	KIT; anti-goat

Antikörper für Immunfluoreszenz:

	1. Antikörper	2. Antikörper
TNF- α	1: 800; rabbit	1:100; anti-rabbit
IL1- β	1:200; rabbit	1:100; anti-rabbit
IL-6	1:100; goat	1:100; anti-goat
CD-68	1:300; mouse	1:100; anti-mouse
NeuN	1:100; mouse	1:100; anti-mouse

2.7 Protokolle der Experimente

Die neurologischen Untersuchungen fanden 24 h oder 48 h nach der 90-minütigen Okklusion der Acm statt.

Von den insgesamt 102 operierten Ratten wurden 29 Tiere aufgrund nicht ausreichender Blutflusssenkung, frühzeitigen Versterbens während oder nach der OP, zerebraler oder subarachnoidaler Blutungen ausgeschlossen. 73 Tiere wurden neurologisch untersucht. Bei 13 Tieren handelte es sich um Sham-Tiere, wovon 6 für die Immunhistochemie und die anderen 7 für die Western-Blot-Untersuchungen verwendet wurden. Von den 60 neurologisch getesteten Tieren wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen 36 Tiere (Vehikel 1d = 10; Pio 1d = 9; Vehikel 2d = 9; Pio 2d = 8) und für die Western-Blot-Analyse 24 Tiere (Vehikel 1d = 6; Pio 1d = 6; Vehikel 2d = 7; Pio 2d = 5) genutzt. Vier der Vehikel-behandelten Tiere wurden zusätzlich für die Immunfluoreszenzuntersuchungen verwendet.

2.7.1 Protokoll 1: Auswirkung der icv Vorbehandlung mit Pioglitazon auf die Blutparameter während der Gehirnischämie

Fünf Tage vor der MCAO wurden die osmotischen Minipumpen gefüllt mit Vehikel (n = 7) und Pioglitazon (n = 7) implantiert.

Nach drei Tagen wurden femorale Arterienkatheter gelegt und am Tag fünf die Acm verschlossen. Die sham-operierten Tiere durchliefen die gleiche Operation ohne Verschluss der Acm. Über den arteriellen Katheter wurde Blut in Glaskapillaren (Volumen von 115 µl) aufgenommen. Die Blutentnahme erfolgte dann zu fünf verschiedenen Zeitpunkten:

- (A) vor der Narkose (am wachen Tier)
- (B) 10 min nach Einleitung der Narkose vor Beginn der Ischämie
- (C) 30 min nach Induktion der Ischämie
- (D) 90 min nach Induktion der Ischämie
- (E) 30 min nach Entfernung des Fadens (Reperfusionsphase)

Mit einem Radiometer ABL 700 SERIE (Radiometer Medical A/S, DK-2700, Dänemark) wurde der pH-Wert, die pCO₂-Konzentration, die pO₂-Konzentration, die Plasmaglukose-Konzentration (cGlu), die Konzentration des Plasmalaktats (cLac) und die Konzentration folgender Elektrolyte: cK⁺, cNa⁺, cCa²⁺, cCl⁻ bestimmt.

2.7.2 Protokoll 2: Auswirkung der icv Vorbehandlung mit Pioglitazon auf die Expression von TNF-α, IL1-β und IL-6 im peri-infarktären Kortex

Die osmotischen Minipumpen gefüllt mit Vehikel- oder Pioglitazon- Lösung wurden implantiert und fünf Tage danach wurde die Acm bei den Vehikel-behandelten und Pioglitazon-behandelten Ratten für 90 min verschlossen. Den Sham-Tieren wurden ebenfalls die Vehikel-gefüllten Minipumpen implantiert. Jedoch wurden bei der zweiten OP nach fünf Tagen nur die Gefäße dargestellt ohne die Acm zu verschließen.

Die Tiere wurden 24 h oder 48 h nach der MCAO neurologisch untersucht und getötet.

Für die Bestimmung der Infarktgröße und die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Ratten mit 4 % Paraformaldehyd perfundiert (24 h nach der MCAO: Sham = 6; Vehikel 1d = 10; Pio 1d = 9 und 48 h nach der MCAO: Vehikel 2d = 9; Pio 2d = 8). Für die Western-Blot-Analyse wurde der perifokale frontoparietale Kortex aus den Gehirnen isoliert (24 h nach der MCAO: Sham = 7; Vehikel 1d = 6; Pio 1d = 6 und 48 h nach der MCAO: Vehikel 2d = 7; Pio 2d = 5).

2.8 Statistische Analyse

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) dargestellt. Die statistische Auswertung des zerebralen Blutflusses und der physiologischen Parameter im Blut erfolgte über eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (MANOVA). Da hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Vehikel-Gruppen und den Pioglitazon-Gruppen festgestellt werden konnten, wurden keine post-hoc Tests durchgeführt. Der Effekt der Ischämie der behandelten und unbehandelten Ratten auf den neurologischen Status (neurologischen Score) wurde mittels des Student's t-Tests analysiert. Der non-parametrische Mann-Whitney-Test wurde für die statistische Analyse der Schlaganfallvolumina und des Ödems von Vehikel- und Pioglitazon- behandelten Tieren herangezogen. Die Signifikanz der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen wurde mit Hilfe des Students't-Test ermittelt und die immun-histochemischen Untersuchungen wurden über eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) analysiert und die paarweisen Vergleiche zwischen der Sham-Gruppe und den Vehikel- und Pioglitazon-vorbehandelten Gruppen erfolgten dann über einen Bonferroni post-hoc Test.

Die Tierversuchsreihen wurden von der Tierschutzkommission des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

3 Ergebnisse

3.1 Regionaler zerebraler Blutfluss (rCBF)

Der Abfall der rCBF-Werte der rechten Kortexregion während der Okklusion war bei den Vehikel-behandelten Tieren ($n = 32$) und den Pioglitazon-behandelten Tieren ($n = 28$) identisch. Die Darstellung (Abb.: 3.1) zeigt die durchschnittlichen rCBF-Werte beider Tiergruppen. Während der ersten 30 min der MCAO lagen die Werte für Vehikel-behandelte Tiere bei $18,2 \pm 6,1$ % und für Pioglitazon-behandelte Tiere bei $17,6 \pm 7$ % und nach weiteren 30 min der MCAO für Vehikel-behandelte Tiere bei $19,1 \pm 5,4$ % und für Pioglitazon-behandelte Tiere bei $19,6 \pm 6,7$. Nach der Reperfusion stieg der rCBF an und erreichte nach 30 min bei den Vehikel-behandelten Tieren $63,1 \pm 20$ % und bei den Pioglitazon-behandelten Tieren $71,2 \pm 26$ %. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messwerten der Pioglitazon-behandelten Tiere und der Vehikel-behandelten Tiere festgestellt.

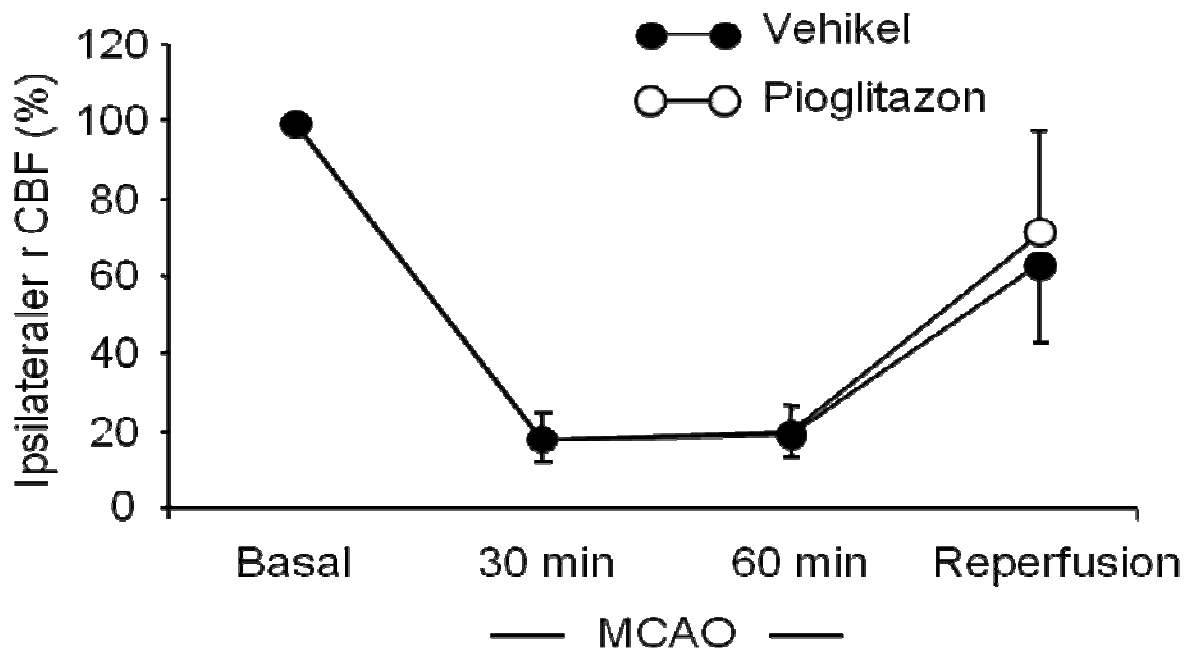


Abbildung 3.1: Der regionale Blutfluss vor, 30 bzw. 60 min nach der MCAO und in der anschließenden Reperfusionphase in dem ischämischen Gehirnbereich bei mit Pioglitazon-behandelten Tieren ($n = 28$) und Vehikel-behandelten Tieren ($n = 32$). Die Werte für den rCBF (Mittelwert \pm SD) sind als Prozentsatz des Ausgangswertes (vor Verschluss der Acm) dargestellt.

3.2 Bestimmung physiologischer Parameter im Blut

Den Ratten wurden zu den bereits erwähnten Zeitpunkten vor und während der Ischämie sowie in der Reperfusionsphase Blutproben aus dem arteriellen Katheter entnommen. Zu keinem Zeitpunkt wurden Unterschiede zwischen den Pioglitazon-, Vehikel- und Sham-Tieren bei den Blutparametern: pH-Wert, pCO₂, pO₂, Glucose- und Laktat- Spiegel sowie die Konzentration der Kalium-, Natrium-, Calcium- und Chloridionen festgestellt (Tab.: 3.1).

pH

	A	B	C	D	E
Sham	7,44 ± 0,02	7,37 ± 0,01	7,39 ± 0,006	7,42 ± 0,01	7,38 ± 0,01
Vehikel	7,47 ± 0,04	7,37 ± 0,03	7,38 ± 0,02	7,41 ± 0,02	7,37 ± 0,02
Pioglitazon	7,48 ± 0,007	7,36 ± 0,02	7,37 ± 0,03	7,39 ± 0,2	7,35 ± 0,02

pCO₂ mmHg

	A	B	C	D	E
Sham	38,9 ± 2,76	50 ± 2	49,3 ± 1,34	43,7 ± 1,96	46,2 ± 1,12
Vehikel	36,2 ± 3,1	51,9 ± 1,4	49,4 ± 2,5	44,2 ± 3	46,3 ± 2,1
Pioglitazon	36,7 ± 1,1	49 ± 3,8	48,8 ± 3,9	45,1 ± 2	48,7 ± 2,5

pO₂ mmHg

	A	B	C	D	E
Sham	87 ± 1,8	83 ± 1,4	79 ± 2,1	84 ± 1,2	78 ± 2,2
Vehikel	96 ± 2,9	76 ± 0,4	77 ± 3,8	79 ± 3,1	81 ± 2,5
Pioglitazon	91 ± 5	80 ± 4,4	80 ± 3,6	79 ± 3,8	76 ± 2,4

cGlu mg/dl

	A	B	C	D	E
Sham	139 ± 7,5	149 ± 17	156 ± 17	153 ± 8,3	156 ± 8,3
Vehikel	122 ± 2	136 ± 17	147 ± 13	167 ± 13	153 ± 14
Pioglitazon	127 ± 10	139 ± 10	138 ± 9	133 ± 7	139 ± 6

cLac mmol/l

	A	B	C	D	E
Sham	3,9 ± 0,5	2,8 ± 0,34	2,2 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,3
Vehikel	3,5 ± 0,4	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,2
Pioglitazon	3 ± 0,9	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,4	1,8 ± 0,2

cK⁺ mmol/l

	A	B	C	D	E
Sham	5,1 ± 0,14	5,3 ± 0,4	5,5 ± 0,24	5,1 ± 0,3	4,7 ± 0,2
Vehikel	4,3 ± 0,3	4,5 ± 0,2	5,3 ± 0,14	5,2 ± 0,33	4,7 ± 0,3
Pioglitazon	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,3	5,8 ± 0,2	5,9 ± 0,23	5,4 ± 0,3

cNa⁺ mmol/l

	A	B	C	D	E
Sham	138 ± 1,2	134 ± 0,5	134 ± 0,4	135 ± 0,8	134 ± 0,5
Vehikel	134 ± 3,9	132 ± 2,2	133 ± 0,5	132 ± 0,5	133 ± 1,1
Pioglitazon	137 ± 1,2	133 ± 0,5	132 ± 0,7	131 ± 0,6	132 ± 0,7

cCa²⁺ mmol/l

	A	B	C	D	E
Sham	1,26 ± 0,05	1,15 ± 0,01	1,18 ± 0,01	1,2 ± 0,02	1,2 ± 0,1
Vehikel	1,37 ± 0,01	1,21 ± 0,03	1,2 ± 0,03	1,2 ± 0,03	1,21 ± 0,02
Pioglitazon	1,32 ± 0,02	1,21 ± 0,01	1,22 ± 0,02	1,2 ± 0,02	1,22 ± 0,01

cCl⁻ mmol/l

	A	B	C	D	E
Sham	101 ± 0,5	99 ± 0,8	98 ± 0,5	100 ± 0,5	100 ± 0,7
Vehikel	102 ± 1,3	101 ± 0,6	99 ± 0,2	100 ± 1	102 ± 1,2
Pioglitazon	101 ± 0,6	100 ± 0,6	99 ± 0,8	100 ± 0,7	101 ± 0,6

Tabelle 3.1: Parameter im Blut: pH-Wert, pCO₂, pO₂, Glucose-Konzentration (cGlu), Laktat-Konzentration (cLac), Kalium-Konzentration (cK⁺), Natrium-Konzentration (cNa²⁺), Calcium-Konzentration (cCa²⁺), Chlorid-Konzentration (cCl⁻) vor während und nach MCAO. Die Blutproben wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten entnommen: A = vor Anästhesie, B = nach Gabe des Anästhetikums, C = 30 min nach Beginn der Okklusion der Acm, D = 90 min nach MCAO, E = 30 min nach Beginn der Reperfusion.

3.3 Neurologische Untersuchungen

Die neurologischen Untersuchungen (Abb.: 3.2) fanden 24 h (Vehikel 1d + Pio 1d) bzw. 48 h (Vehikel 2d + Pio 2d) nach MCAO statt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die mit Pioglitazon-behandelten Tiere (n: Pio 1d = 15; Pio 2d = 13) sowohl 24 h als auch 48 h nach MCAO signifikant bessere sensorische Funktionen aufwiesen als die mit Vehikel-behandelten Tiere (n: Vehikel 1d = 16; Vehikel 2d = 16). Diese Ergebnisse spiegelten sich hauptsächlich nach 48 h bei den sensorischen Ausfällen wieder (Körper-Propriozeption: p < 0,001 und Berührung der Vibrissen: p < 0,05).

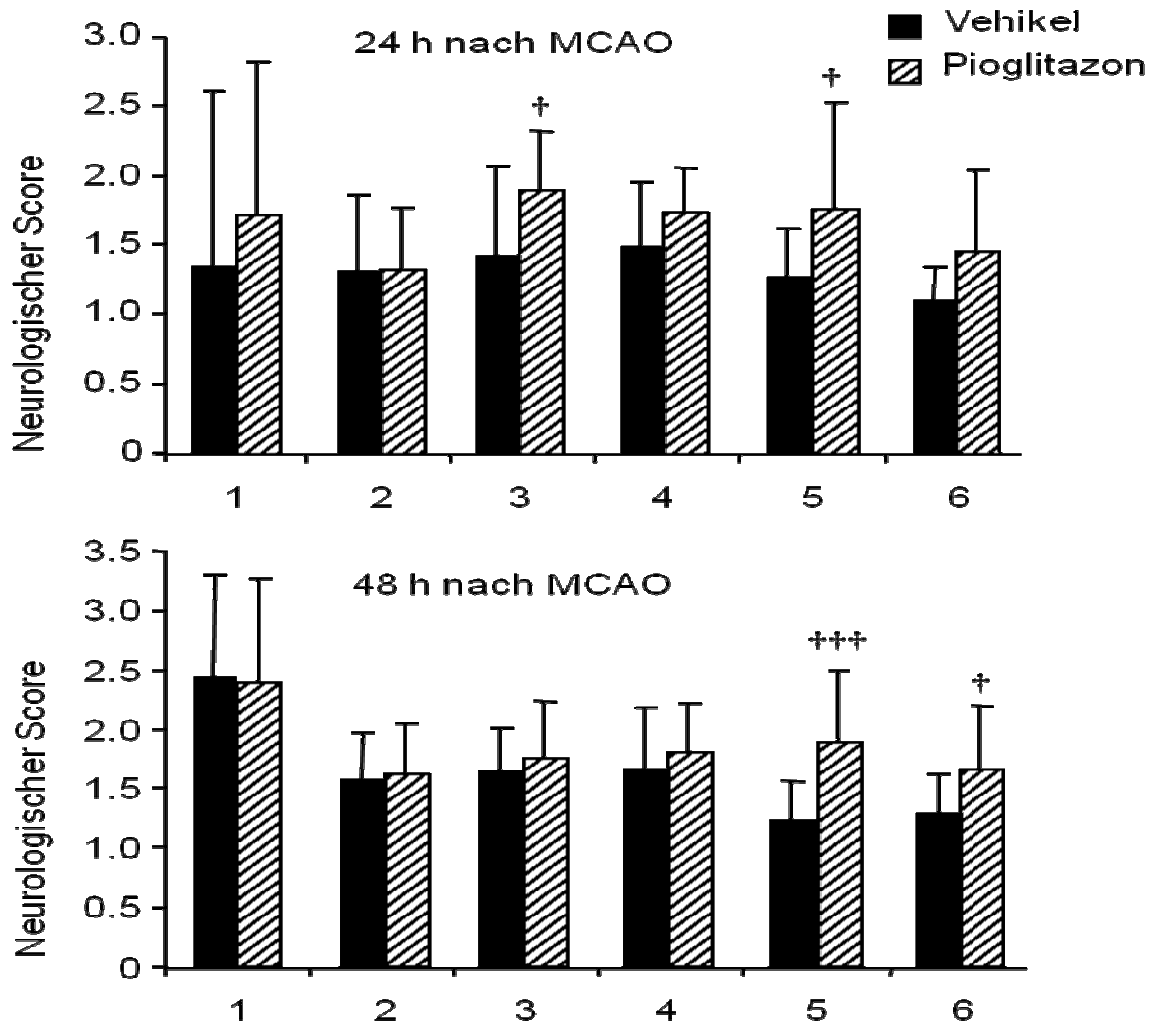


Abbildung 3.2: Neurologischer Score 24 h nach MCAO für Vehikel-behandelte (schwarze Säulen) (V 1d = 16) und Pioglitazon-behandelte Ratten (schraffierte Säulen) (P 1d = 15) und 48 h nach MCAO für Vehikel-behandelte (V 2d = 16) und Pioglitazon-behandelte Tiere (P 2d = 13). Verwendete neurologische Tests (Garcia et al., 1995): 1 = spontane Aktivität; 2 = symmetrische Bewegung der vier Pfoten; 3 = Ausstreckung der Vorderpfoten; 4 = Klettern; 5 = Körper-Propriozeption; 6 = Antwort auf die Berührung der Vibrissen. Diese neurologischen Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse im Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren = [†] $p < 0,05$ und ^{†††} $p = 0,0001$ wurde mit dem Student's t-Test ermittelt.

3.4 Infarktvolumen und Infarktödem

Die ischämischen Gehirnschäden betreffen das Versorgungsgebiet der Acm. Dieses besteht aus Teilen des frontoparietalen und frontotemporalen Kortex sowie den lateralen und medialen Segmenten des Corpus striatum. Das Infarktvolumen und das Ödem war bei mit Pioglitazon-behandelten Tieren zu beiden Zeitpunkten kleiner als bei mit Vehikel-behandelten Tieren (Abb.: 3.3).

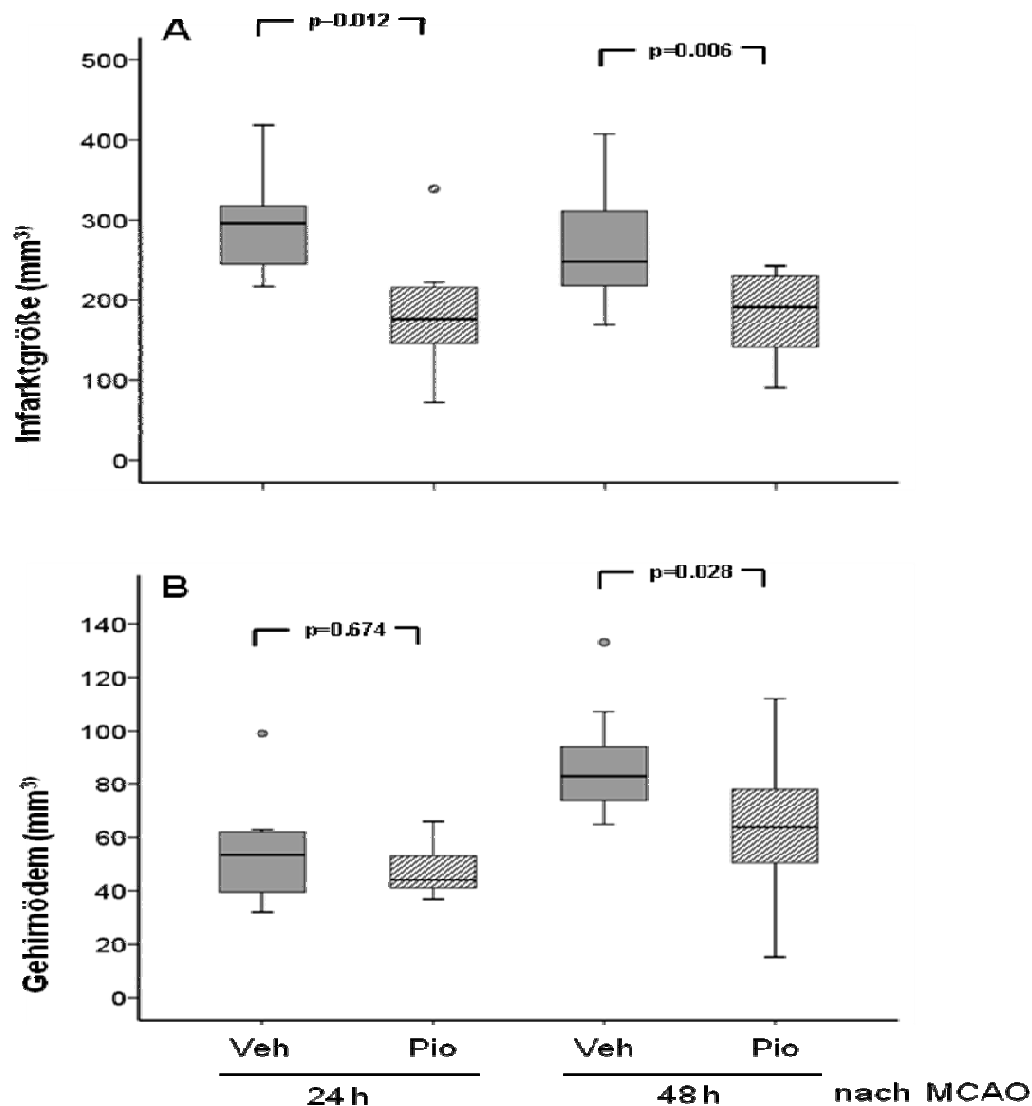


Abbildung 3.3: Auswirkung von Pioglitazon (schraffierte Säulen) bzw. von Vehikellösung (graue Säulen) auf die Infarktgröße und das Gehirnödem 24 h und 48 h nach einer MCAO mit anschließender Reperfusion. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Der statistische Vergleich zwischen Vehikel- und Pioglitazon-Gruppen wurde mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney Test ermittelt.

3.5 Aktivierung zerebraler PPAR- γ reduziert TNF- α , IL-1 β und IL-6 im frontoparietalen Kortex im peri-infarktären Bereich

Nach Beginn einer Ischämie fangen die geschädigten Gehirnzellen an in zunehmendem Maße Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 zu produzieren. Durch die immunhistochemischen und Immunfluoreszenzdarstellungen werden die TNF- α , IL-1 β und IL-6 exprimierenden Zellen aufgezeigt. Die Immunfluoreszenzdarstellungen dienen der Visualisierung der Zellarten, in denen diese Zytokine induziert werden.

3.5.1 TNF- α -Expression nach zerebraler Ischämie und der Effekt von Pioglitazon

Wie erwartet erhöhte die zerebrale Ischämie die Expression von TNF- α im ischämischen frontoparietalen Kortex und die Vorbehandlung mit Pioglitazon verminderte deutlich die gesteigerte Expression von dem Zytokin (Abb.: 3.4).

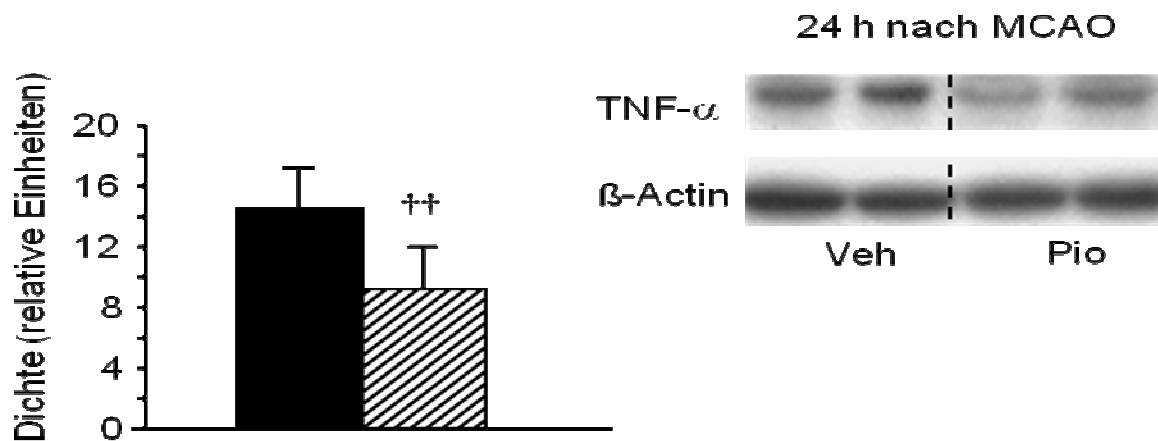


Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse von TNF- α im frontoparietalen Kortex im Bereich der Penumbra: Rechts: Exemplarische Darstellung der Expression von TNF- α in der Penumbra nach der MCAO in den Vehikel-behandelten und den Pioglitazon-behandelten Ratten. Links: Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin) in Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (schraffierte Säulen) Ratten 24 h nach der MCAO. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Der statistische Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren: $p^{\dagger\dagger} < 0,01$ (Student's t -test).

Die Anzahl der TNF- α -Zellen im frontoparietalen Kortex des Penumbra-Bereichs der Vehikel-behandelten Tiere war im Vergleich mit den Sham-Tieren 24 h und 48 h nach MCAO in den immunhistochemischen Untersuchungen erhöht (Abb.: 3.5). Die Pioglitazon-behandelten Tiere wiesen in allen drei getesteten Gehirnbereichen eine signifikant geringere Anzahl der TNF- α -Zellen als die Vehikel-behandelten Tiere auf.

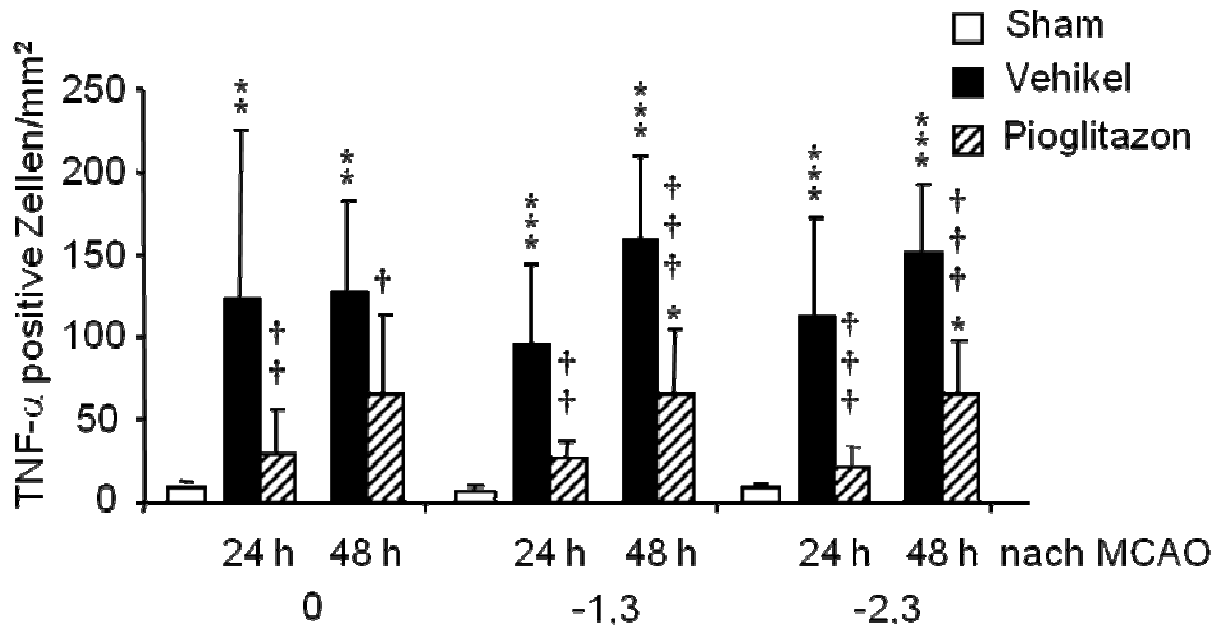


Abbildung 3.5: Anzahl der TNF- α -positiv-gefärbten Zellen im peri-infarktären Bereich des frontoparietalen Kortex: Verglichen wird die Zahl der TNF- α -positiven Zellen 24 h und 48 h nach MCAO aus drei Ebenen des Gehirns (0 mm; -1,3 mm; -2,3 mm vom Bregma) bei sham-operierten (weiße Säulen), Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (gestreifte Säulen) Tieren. Der statistische Vergleich mit sham-operierten Tieren: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ und mit Vehikel-behandelten Tieren: † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ und ††† $p < 0,001$ erfolgte mit ANOVA und Bonferroni post-hoc Test.

Die transiente MCAO bewirkte im ischämischen zerebralen Kortex eine TNF- α -Induktion. Diese fand in den Immunfluoreszenzuntersuchungen fast ausschließlich in den Neuronen statt und war nur gering in den Mikrogliazellen nachzuweisen (Abb.: 3.6).

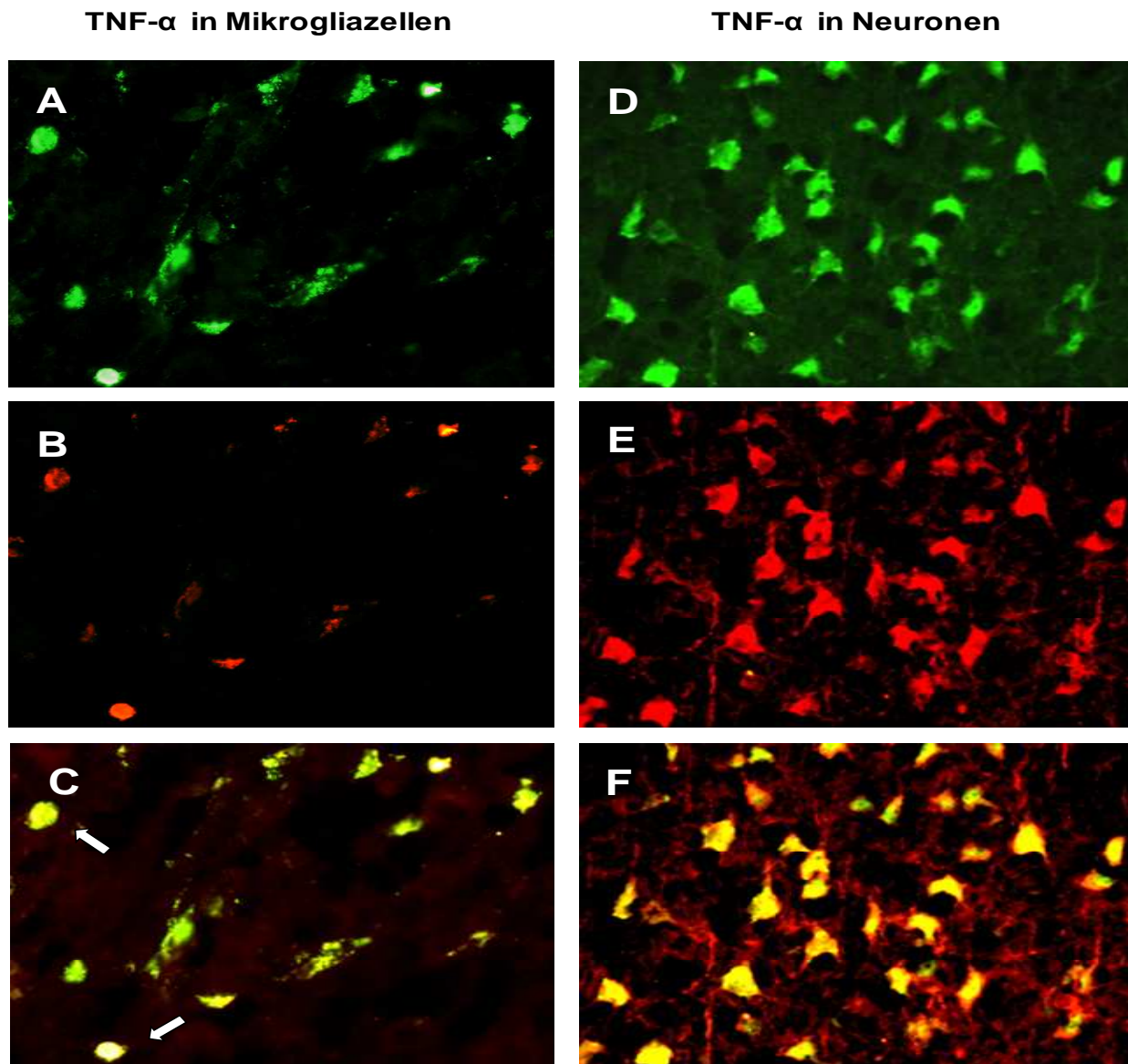


Abbildung 3.6: Detektion von $TNF-\alpha$ in aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68) und Neuronen (NeuN) in der Penumbra von Vehikel-behandelten Tieren 24 h nach MCAO:

A) Färbung der Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68, grün)

B) $TNF-\alpha$ -Färbung (rot)

C) Kolokalisation von $TNF-\alpha$ und CD-68 (gelb): Nur wenige Mikrogliazellen/Makrophagen exprimieren $TNF-\alpha$ (weiße Pfeile).

D) Färbung von Neuronen (NeuN, grün)

E) $TNF-\alpha$ -Färbung (rot)

F) Die Kolokalisation von $TNF-\alpha$ und NeuN (gelb) demonstriert, dass fast alle Neurone im Randbereich des Infarktes $TNF-\alpha$ exprimieren.

3.5.2 IL-1 β -Expression nach zerebraler Ischämie

Durch die zerebrale Ischämie wurde auch das IL-1 β -Protein im Gehirn 24 h und 48 h nach MCAO im frontoparietalen Kortex stark induziert. Die Expression von IL-1 β wurde durch die Vorbehandlung mit Pioglitazon deutlich reduziert (Abb.: 3.7).

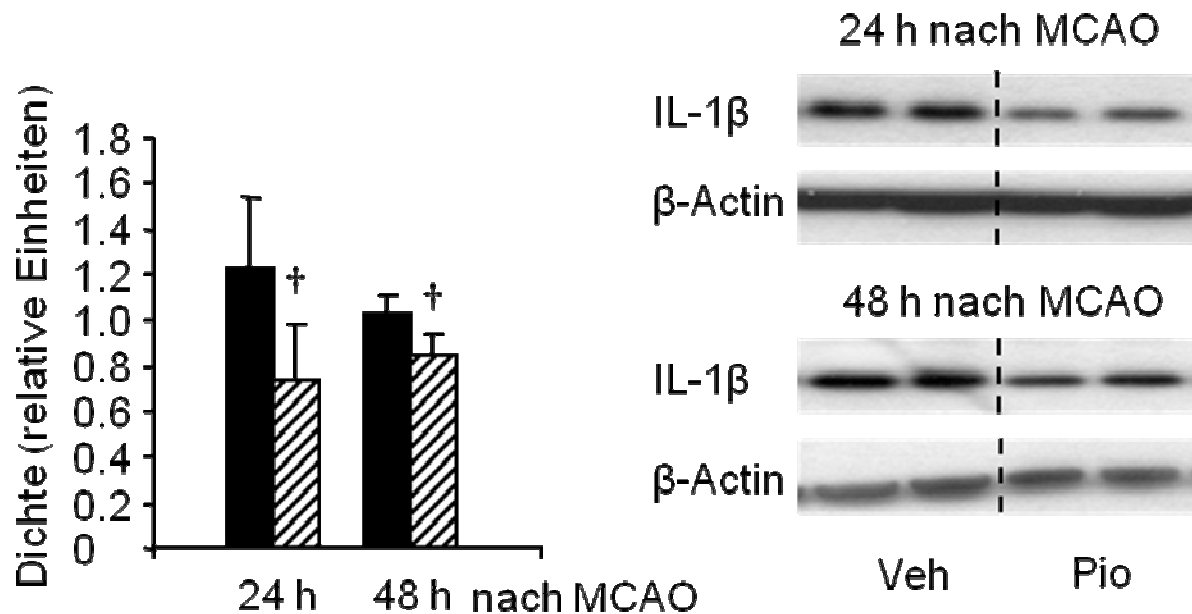


Abbildung 3.7: Western-Blot-Analyse von IL-1 β im frontoparietalen Kortex im Bereich der Penumbra: Rechts: Exemplarische Darstellung der Expression von IL-1 β in der Penumbra nach der MCAO in den Vehikel-behandelten und den Pioglitazon-behandelten Ratten. Links: Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin) in Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (schraffierte Säulen) Ratten 24 h und 48 h nach der MCAO. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Der statistische Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren: $p^{\dagger} < 0,05$ (Student's t-test).

Vergleichbare Resultate ergaben auch die immunhistochemischen Versuche. Sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO zeigten Vehikel-behandelte Tiere im Vergleich mit sham-operierten Tieren eine erhöhte Anzahl IL-1 β -positiver Zellen im peri-infarktären Gewebe. Die Pioglitazon-vorbehandelten Tiere wiesen im Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren eine deutlich reduzierte IL-1 β -Expression sowohl 24 h als auch 48 h nach MCAO in allen drei getesteten Bereichen des Gehirns auf (Abb.: 3.8).

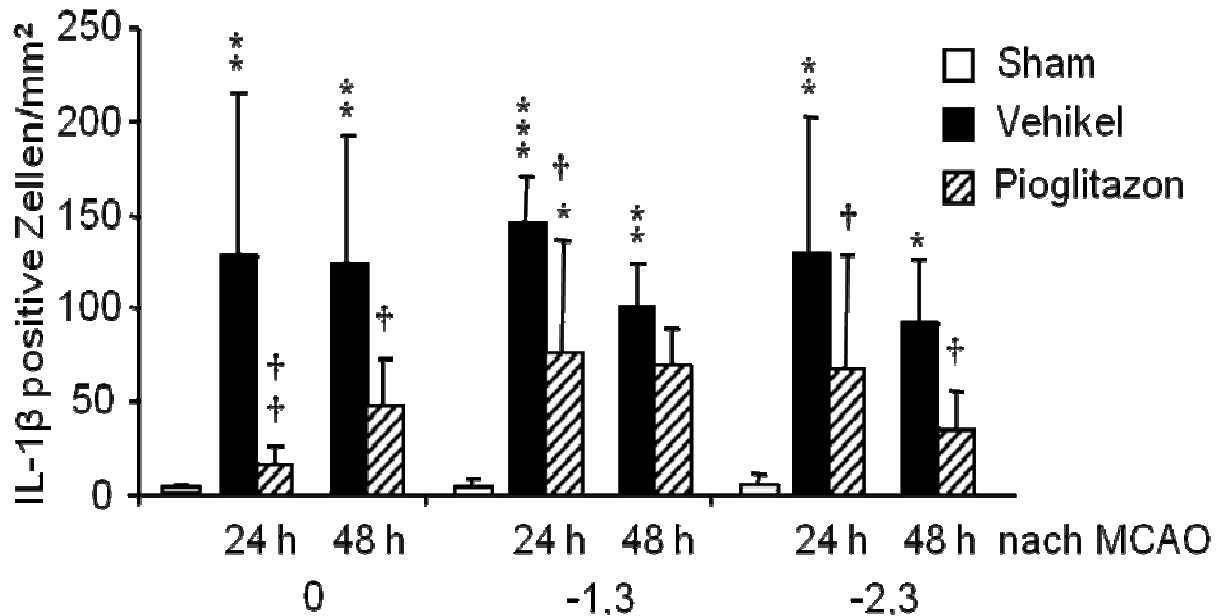


Abbildung 3.8: Anzahl der IL-1 β -positiv-gefärbten Zellen im peri-infarktären Bereich des frontoparietalen Kortex: Verglichen wird die Zahl der IL-1 β -positiven Zellen 24 h und 48 h nach MCAO aus drei Ebenen des Gehirns (0 mm; -1,3 mm; -2,3 mm vom Bregma) bei sham-operierten (weiße Säulen), Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (gestreifte Säulen) Tieren. Der statistische Vergleich mit sham-operierten Tieren: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ und mit Vehikel-behandelten Tieren: † $p < 0,05$ und †† $p < 0,01$ erfolgte mit ANOVA und Bonferroni post-hoc Test.

Nach der MCAO wurde IL-1 β hauptsächlich in Mikrogliazellen/Makrophagen induziert. Nur wenige Neurone exprimierten nach der MCAO IL-1 β (Abb.: 3.9).

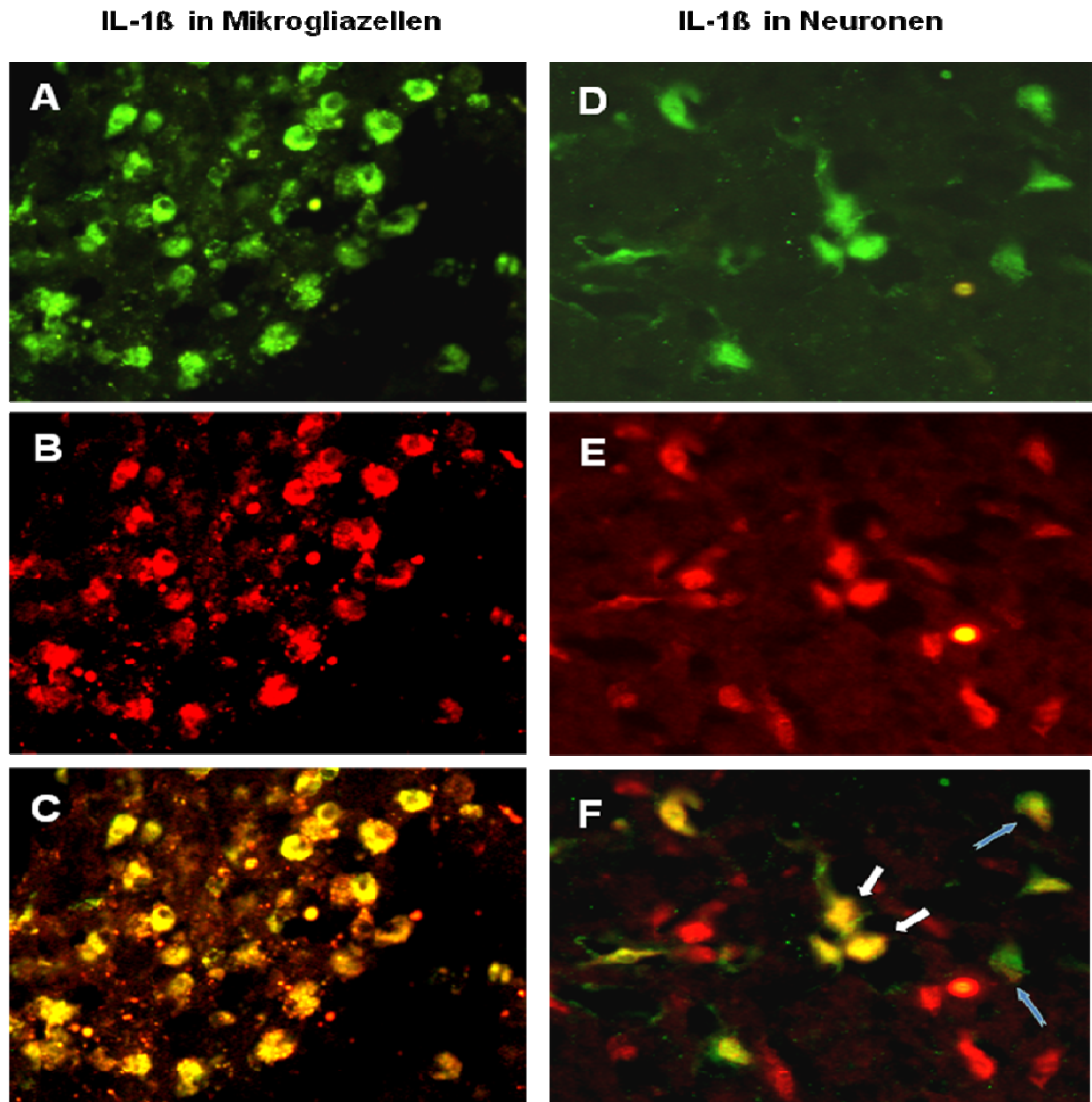


Abbildung 3.9: Detektion von IL-1 β in aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68) und Neuronen (NeuN) in der Penumbra von Vehikel-behandelten Tieren 24 h nach MCAO:

A) Färbung der Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68, grün)

B) IL-1 β -Färbung (rot)

C) Kolokalisation von IL-1 β und CD-68 (gelb): Fast alle Mikrogliazellen/Makrophagen exprimieren IL-1 β .

D) Färbung von Neuronen (NeuN, grün)

E) IL-1 β -Färbung (rot)

F) Kolokalisation von IL-1 β und NeuN (weiße Pfeile). Neurone, die kein IL-1 β exprimieren, sind mit blaue Pfeilen gekennzeichnet.

3.5.3 IL-6-Expression nach zerebraler Ischämie

Die Western-Blot-Analysen von IL-6 im peri-infarktären frontoparietalen Kortex zeigten nur in der akuten Phase eine Reduktion der IL-6 Produktion durch die zerebrale PPAR- γ -Aktivierung. Die IL-6 Konzentration war 24 h nach MCAO bei Pioglitazon-behandelten Tieren im Vergleich mit den Vehikel-behandelten Tieren signifikant reduziert (Abb.: 3.10), jedoch nicht mehr nach 48h.

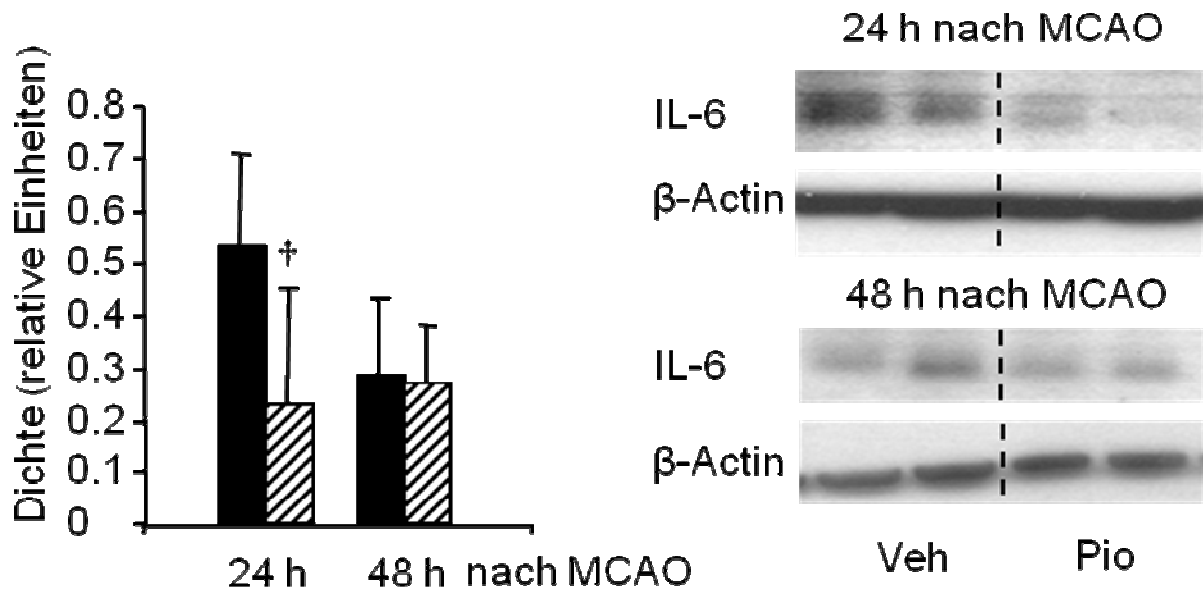


Abbildung 3.10: Western-Blot-Analyse von IL-6 im frontoparietalen Kortex im Bereich der Penumbra: Rechts: Exemplarische Darstellung der Expression von IL-6 in der Penumbra nach der MCAO in den Vehikel-behandelten und den Pioglitazon-behandelten Ratten. Links: Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin) in Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (schraffierte Säulen) Ratten 24 h und 48 h nach der MCAO. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Der statistische Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren: $p^{\dagger} < 0,05$ (Student's t-test).

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten im Vergleich mit den Sham-Tieren eine erhöhte Anzahl von IL-6-Zellen bei den Vehikel-behandelten Tieren im Bereich der Penumbra 24 h und 48 h nach MCAO auf. Pioglitazon senkte signifikant 24 h nach MCAO die Zahl der IL-6-positiven Zellen im Gehirn in allen drei getesteten Gehirnbereichen (Abb.: 3.11), aber nicht nach 48 h.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass Pioglitazon die IL-6-Induktion vor allem in der Akutphase reduziert.

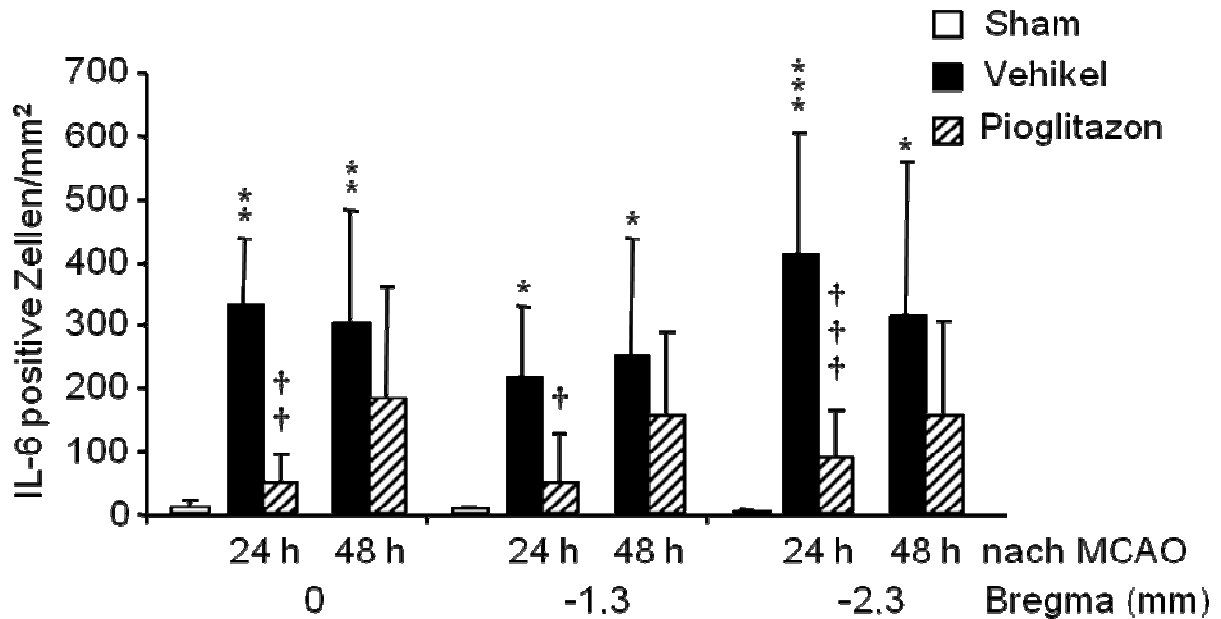


Abbildung 3.11: Anzahl der IL-6-positiv-gefärbten Zellen im peri-infarctären Bereich des frontoparietalen Kortex: Verglichen wird die Zahl der IL-6-positiven Zellen 24 h und 48 h nach MCAO aus drei Ebenen des Gehirns (0 mm; -1,3 mm; -2,3 mm vom Bregma) bei sham-operierten (weiße Säulen), Vehikel-behandelten (schwarze Säulen) und Pioglitazon-behandelten (gestreifte Säulen) Tieren. Der statistische Vergleich mit sham-operierten Tieren: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ und mit Vehikel-behandelten Tieren: † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ und ††† $p < 0,001$ erfolgte mit ANOVA und Bonferroni post-hoc Test.

In den Immunfluoreszenzuntersuchungen produzierten die meisten Zellen im frontoparietalen Kortex nahe des ischämischen Kerns IL-6. Die Mehrheit der Mikrogliazellen/Makrophagen wiesen eine intensive IL-6-Immunreaktivität auf (Abb.: 3.12, weiße Pfeile). Einige Mikrogliazellen/Makrophagen waren nicht positiv gefärbt für IL-6 (Abb.: 3.12, blauer Pfeil). IL-6 wurde auch in den Neuronen induziert (Abb.: 3.12, weiße Pfeile), jedoch war das Zytokin nicht in allen Neuronen nachweisbar.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die IL-6-positiven Zellen nur in stark beschädigten und absterbenden Zellen vorhanden sind und dass IL-6 nicht in den morphologisch intakten Neuronen exprimiert wird.

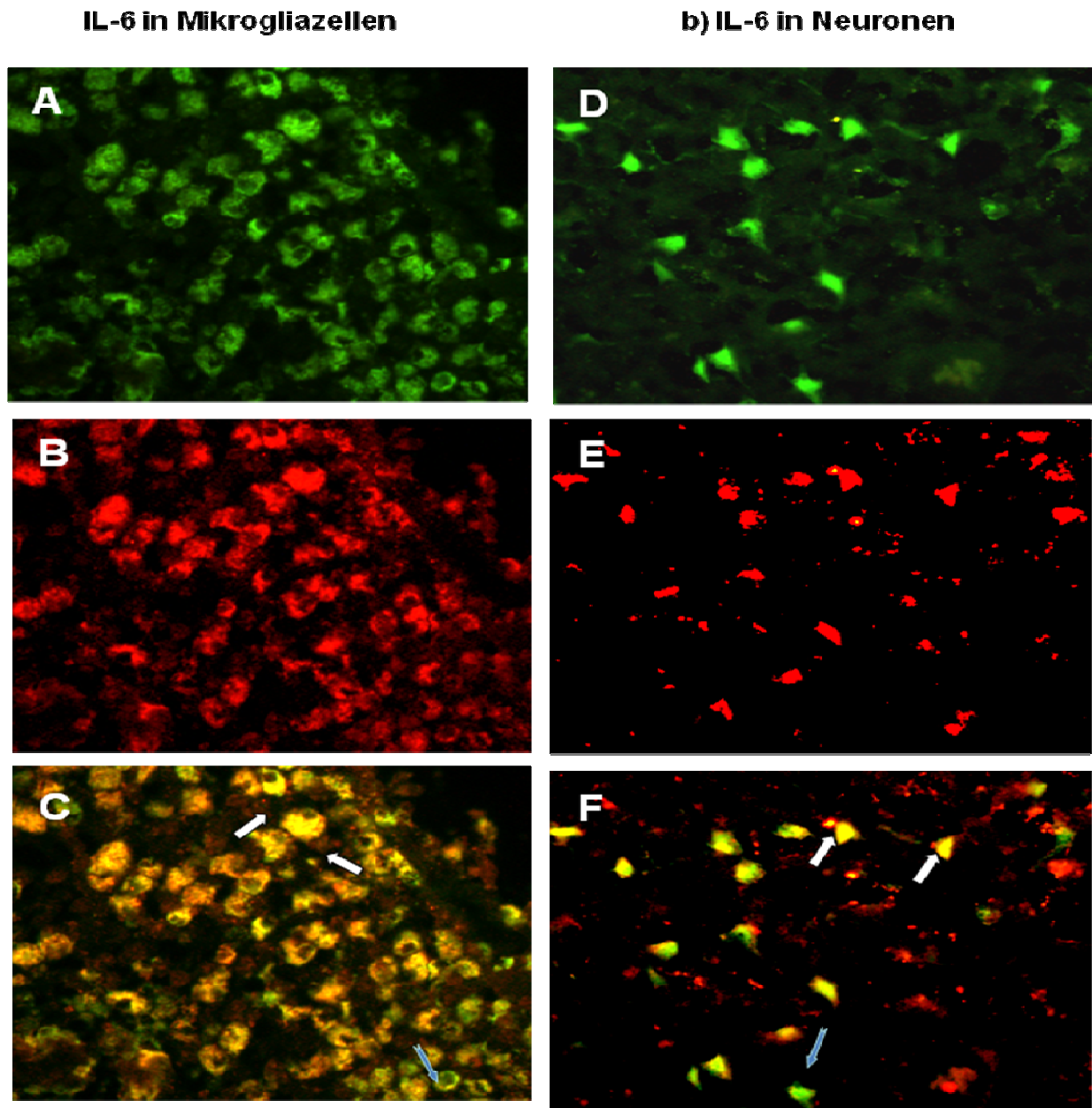


Abbildung 3.12: Detektion von IL-6 in aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68) und Neuronen (NeuN) in der Penumbra von Vehikel-behandelten Tieren 24 h nach MCAO:

A) Färbung der Mikrogliazellen/Makrophagen (CD-68, grün)

B) IL-6-Färbung (rot)

C) Kolokalisation von IL-6 und CD-68 (gelb): Fast alle Mikrogliazellen/Makrophagen exprimieren IL-6 (weiße Pfeile) und nur wenige dieser Entzündungszellen exprimieren kein IL-6 (blauer Pfeil).

D) Färbung von Neuronen (NeuN, grün)

E) IL-6-Färbung (rot)

F) Kolokalisation von IL-6 und NeuN (gelb). Manche Neurone im Randbereich des Infarktes sind positiv gefärbt für IL-6 (weiße Pfeile). Der blaue Pfeil zeigt ein Neuron, das kein IL-6 exprimiert.

Einige Neurone wiesen in der Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchung eine intensive IL-6-Immunreaktivität auf (Abb.: 3.13, C; weiße Pfeile) und eine große Anzahl dieser Neurone exprimierte auch IL-1 β (Abb.: 3.13, D; roter Pfeil). In den Untersuchungen waren auch Neurone zu beobachten, die weder IL-1 β noch IL-6 enthielten oder Neurone, die nur IL-6 exprimierten.

IL 1 β + IL-6 in Neuronen

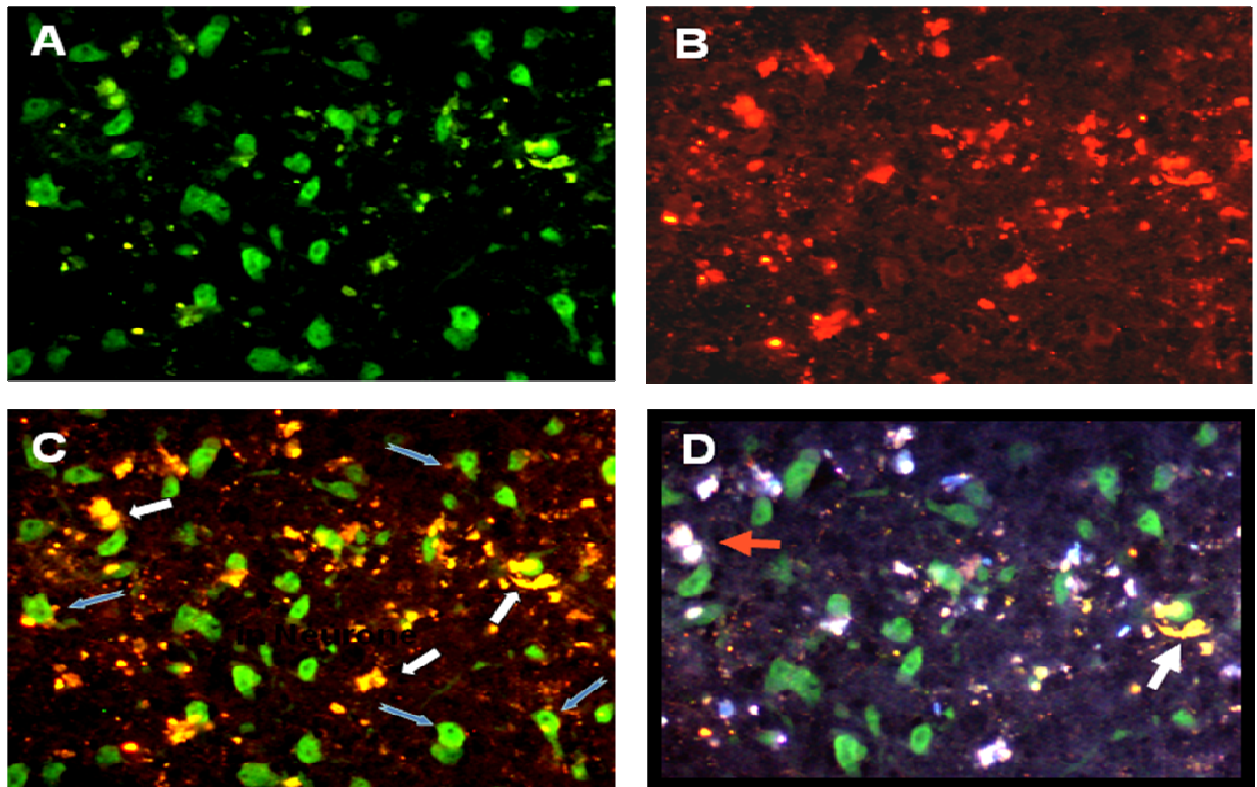


Abbildung 3.13: Detektion von IL-6 und IL-1 β in Neuronen (NeuN) im Bereich der Penumbra von Vehikel-behandelten Tieren 24 h nach MCAO:

A) Neurone (grün),

B) IL-6 exprimierende Zellen (rot)

C) Kolokalisation von IL-6 und NeuN: Einige Neurone im Bereich der Penumbra sind positiv gefärbt für IL-6 (weiße Pfeile) und manche sind nicht gefärbt (blaue Pfeile).

D) Kolokalisation von IL-6 und NeuN (weißer Pfeil) und von IL-6, IL-1 β und NeuN (roter Pfeil). Die grün gefärbten Neurone enthalten weder IL-6 noch IL-1 β .

4 Diskussion

Unsere Daten zeigen, dass Pioglitazon die überhöhte Expression von Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IL-6 in der akuten Phase nach dem ischämischen Insult effektiv unterdrückt. Über diesen Mechanismus werden auch die post-ischämischen Entzündungsreaktionen, welche die Auswirkung der Ischämie im Gehirngewebe verschlimmern und zum neuronalen Tod beitragen, deutlich verringert. Die vorliegenden Untersuchungen bieten deshalb neue Einblicke in den Mechanismus der PPAR- γ -vermittelten Neuroprotektion nach einem ischämischen Schlaganfall.

Die Versuche wurden an Ratten durchgeführt, da sie der zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie des Menschen zu großen Teilen entsprechen und somit erlauben, die pathologischen Abläufe nach einem Schlaganfall zu erforschen. Es wurden zahlreiche Schlaganfallversuche an Ratten durchgeführt. Für diese Arbeit wurde eine Methode angewandt, bei der die Acm mit Hilfe eines Monofilaments für eine Dauer von 90 min verschlossen wurde. Aus vorherigen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass nach diesem Zeitraum stark ausgeprägte Schlaganfälle entstehen. Bei einer Okklusion von 30 min wird das Gehirn nur leicht geschädigt, wodurch die Folgen des Schlaganfalls schwieriger zu bewerten sind. Wenn der Verschluss der Acm länger als 90 min dauert, ist die Überlebensrate der Tiere stark reduziert (McAuley et al. 1995).

In unseren Versuchen wurde Pioglitazon verwendet. Obwohl Pioglitazon im Vergleich zu Rosiglitazon eine niedrigere Affinität zu PPAR- γ aufweist (Lehmann et al. 1995), scheint es bei einer systemischen Behandlung effektiver als Rosiglitazon zu wirken. Der Grund dafür sind zusätzliche Faktoren, wie die Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke und eine effektivere und lang andauernde Akkumulation im Gehirn (Maeshiba et al. 1997). Die gleichen Dosen beider PPAR- γ -Agonisten zeigten eine vergleichbare Neuroprotektion in vivo und in vitro (Tureyen et al. 2007).

4.1 Intrazerebroventrikuläre Behandlung mit Pioglitazon

Wie bereits erwähnt, ist PPAR- γ wesentlich an der Reifung der Präadipozyten zu Adipozyten sowie am Glucose- und Fettstoffwechsel beteiligt (Desvergne und Wahli 1999).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Thiazolidinedione über die Stimulation von PPAR- γ die inflammatorischen Reaktionen unterdrücken. Als Hauptmechanismus wird die

Transrepression diskutiert, ein Mechanismus, über den die aktivierten PPAR- γ die Transkription von inflammatorischen Genen in Makrophagen und anderen entzündlichen Zellen hemmen. Dadurch wird auch die Aktivität der Mikrogliazellen, der Makrophagen, Neutrophilen, T- und B- Lymphozyten vermindert (Ricote et al. 1999, Ricote und Glass 2007). In mehreren Publikationen wurde über die günstigen Effekte einer systemischen oder intrazerebralen Behandlung mit PPAR- γ -Agonisten bei ischämischen Schlaganfällen berichtet. Diese Effekte wurden in den meisten Fällen der Hemmung der inflammatorischen Reaktionen zugeschrieben.

Da die Thiazolidinedione die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, tragen bei einer systemischen Behandlung mit den synthetischen PPAR- γ -Agonisten sowohl die peripheren als auch die zentralen Effekte zu einem verbesserten neurologischen Status nach einer zerebralen Ischämie bei. Die Aktivierung von zerebralen EC durch zahlreiche Zytokine, wie z.B. IL-1 β und TNF- α stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen an ihrer Oberfläche. Die Adhäsionsmoleküle bewirken eine Anheftung und Migration von Granulozyten und Makrophagen ins ischämische Gewebe sowie die Aktivierung dieser Zellen, welche zusammen mit der aktivierten Mikroglia die wichtigen Faktoren produzieren, die zum neuronalen Zelltod führen. PPAR- γ -Agonisten vermindern die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Anheftung von Lymphozyten (Sasaki et al. 2005). Auch die Hemmung der EC-Aktivierung und der Synthese von dem C-reaktiven Protein und dem Fibrinogen tragen entscheidend zu der Unterdrückung der post-ischämischen Inflammation bei. Darüber hinaus hemmen die PPAR- γ -Agonisten die Freisetzung von Endothelin-1 aus den EC und verhindern somit die lokale Vasokonstriktion, die zur Verschlechterung der zerebralen Durchblutung in der Penumbra führen kann. Pioglitazon verhindert auch den oxidativen Stress in EC, reduziert erhöhten Blutdruck und stimuliert die NO-Produktion und die Expression der neuronalen NOS (Dobrian et al. 2004). Diese Befunde zeigen deutlich, dass eine Aktivierung von PPAR- γ die endotheliale Dysfunktion verringert und die Durchblutung des zerebralen ischämischen Gewebes verbessert und somit zur Verminderung der Infarktgröße und der neurologischen Ausfälle beitragen kann.

PPAR- γ wird im ischämischen Gehirngewebe nach MCAO stark induziert. In dem am Rand des ischämischen Kerns liegenden zerebralen Kortex ist eine vorübergehende Hochregulation der PPAR- γ -mRNA und eine vermehrte Akkumulation der PPAR- γ -positiven Zellen bereits nachgewiesen worden (Ou et al. 2006, Zhao et al. 2006). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde auch in unserem Labor eine Induktion des PPAR- γ -Proteins im ischämischen frontoparietalen Kortex festgestellt (Patzner et al. 2008). Der Rezeptor wurde in allen

Mikrogliazellen/Makrophagen und in manchen Neuronen in der Penumbra lokalisiert (Zhao et al. 2006). Darüber hinaus scheinen die PPAR- γ -Agonisten die Expression des PPAR- γ weiter zu erhöhen. Luo et al. (2006) berichteten über eine Induktion von PPAR- γ nach einer icv Gabe des endogenen Agonisten 15-d-PGJ₂. Vor Kurzem wurde auch beobachtet, dass eine icv Behandlung mit Pioglitazon die Ischämie-induzierte Expression von PPAR- γ weiter erhöht (Patzner et al. 2008). Auf der anderen Seite vermindert die ischämische Schädigung des Gehirngewebes die Aktivität des PPAR- γ und dessen Bindung an die entsprechenden DNA-Konsensussequenzen. Eine icv Injektion von 15-d-PGJ₂ oder eine systemische Behandlung mit Rosiglitazon stellt die gestörte Bindungsaffinität des PPAR- γ zur DNA im ischämischen Kortex nicht nur wieder her, sondern erhöht die Bindung des aktivierten Rezeptors zur DNA deutlich (Ou et al. 2006). Diese Befunde zeigen deutlich, dass die PPAR- γ -Agonisten nicht nur die Expression des PPAR- γ im ischämischen Gewebe induzieren, sondern auch dessen Bindungsaktivität zur DNA erhöhen. Deshalb ist es wichtig, die Effekte einer zentralen Aktivierung der PPAR- γ nach einem ischämischen Schlaganfall zu untersuchen. Die icv oder intraparenchymale Applikation des Agonisten ist die einzige Möglichkeit die peripheren Effekte der PPAR- γ -Aktivierung auszuschließen und nur die zentralen Auswirkungen zu erforschen. In unseren Versuchen wurde Pioglitazon ununterbrochen ab fünf Tagen vor MCAO bis ein oder zwei Tage nach MCAO icv infundiert, um eine selektive Aktivierung der PPAR- γ im Gehirngewebe zu erreichen, ohne die peripheren PPAR- γ zu beeinflussen. In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendete Dosis von Pioglitazon ausreichend ist, um das ischämische kortikale Gewebe mit dem Agonisten zu saturieren und dass die Effekte der PPAR- γ -Aktivierung sich deshalb voll entfalten können (Patzner et al. 2008).

4.2 Zerebrale PPAR- γ und Neuroprotektion

Die Ziele in der Schlaganfalltherapie sind die Verbesserung der Funktion der betroffenen Neurone, die Minimierung der neurologischen Verluste und die Reduktion der Infarktgröße. Die systemische Vorbehandlung mit verschiedenen PPAR- γ -Agonisten zeigte, dass diese Substanzklasse den neurologischen Status verbesserte und das Infarktvolumen verkleinerte. Ähnliche Effekte konnten wir auch nach der icv Behandlung der Ratten mit Pioglitazon beobachten. Der neurologische Status wurde 24 h und 48 h nach MCAO ermittelt, um eine zeitliche Entwicklung der neurologischen Beeinträchtigung während der akuten Phase nach

dem ischämischen Insult zu erfassen. Darüber hinaus wurde eine Methode zur Bestimmung des neurologischen Status verwendet, die eine genaue Untersuchung motorischer und sensorischer Defizite ermöglicht (Garcia et al. 1995). Im Gegensatz zu einer selektiven und andauernden Blockade der AT1-Rezeptoren im Gehirn, die schon 24 h nach dem ischämischen Insult die motorischen Ausfälle verbessert (Lou et al. 2004), hatte eine Stimulation der PPAR- γ vor und während der ischämischen Periode keinen Einfluss auf die neurologischen Defizite. Erst die Nachbehandlung mit Pioglitazon nach MCAO verminderte signifikant den Grad der sensorischen Ausfälle (Körper-Propriozeption und Reaktion auf Berührung der Vibrissae). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Entwicklung von motorischen und sensorischen Defiziten auch bei Versuchstieren nach einem Schlaganfall unterschiedlich verlaufen kann und deshalb eine differenzierte Untersuchung beider neurologischen Störungen erforderlich ist.

Der PPAR- γ -Agonist reduzierte das Infarktvolumen an beiden Tagen nach dem Schlaganfall. Entscheidend ist die Unterdrückung der post-inflammatorischen Reaktionen. Die icv Behandlung mit Pioglitazon reduziert deutlich die Akkumulation von Makrophagen und aktivierter Mikroglia im Randgebiet der Ischämie (Zhao et al. 2005).

4.3 Post-ischämische Inflammation: Die Rolle der Zytokine

Zerebrale Ischämie aktiviert pro-inflammatorische Gene in beschädigten Neuronen und Mikroglia. Die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 und die darauf folgende Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der EC bewirken eine Migration von Granulozyten und Makrophagen in das ischämische Gehirngewebe. Für die beobachtete verringerte Akkumulation dieser Entzündungszellen im Randgebiet der Ischämie kann bei Ratten, bei denen Pioglitazon icv infundiert wird, eine Reduktion der Expression von Zytokinen verantwortlich sein (Zhao et al. 2005). Tatsächlich haben wir beobachtet, dass in der akuten Phase (24 h nach dem ischämischen Insult) die Produktion der oben genannten Zytokine in dem Ischämie-Randgebiet des frontoparietalen Kortex signifikant gehemmt wird. In zwei Punkten unterscheiden sich unsere Experimente von denen, welche die Expression von Zytokinen nach einer systemischen Vorbehandlung mit verschiedenen PPAR- γ -Agonisten vor dem Schlaganfall untersuchten. Erstens haben wir die Konzentrationen der Proteine und nicht der mRNAs für die jeweiligen Zytokine im ischämischen Gewebe gemessen. Es wurde gezeigt, dass während der Hypoxie viel mRNA

produziert wird, welche dann nicht in die entsprechenden Proteine umgeschrieben sondern abgebaut wird (Roux-Lombard 1998). Zweitens haben wir die Protein-Spiegel in einem genau definierten ischämischen Randgebiet des frontoparietalen Kortex bestimmt. In vielen Studien wurde die Expression von mRNAs im ganzen ischämischen Kortex untersucht, bestehend aus der Penumbra, dem ischämischen Kern und dem gesunden von der Ischämie nicht betroffenen Gewebe. In unseren Versuchen wurden auch die dem ischämischen Kern angrenzenden Zellen im frontoparietalen Kortex identifiziert, welche die jeweiligen Zytokine nach der MCAO exprimieren.

4.4 Pioglitazon und TNF- α nach einem ischämischen Schlaganfall

Die icv Behandlung mit Pioglitazon hat die Produktion von TNF- α im ischämischen Randgebiet des Kortex effektiv inhibiert. In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass TNF- α ein potenter Mediator für das Absterben der beschädigten Neurone und die nachfolgende Hirnschädigung nach einer zerebralen Ischämie ist. Der durch TNF- α ausgelöste neuronale Zelltod wird durch den TNFR1 und dessen Signaltransduktionskaskaden ausgelöst. Zu diesen gehört die Aktivierung von NF- κ B, wodurch die Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Gene, wie die TNF- α -Gene, und die Apoptose auslösenden Gene initiiert werden sowie die ununterbrochene Aktivierung von JNK (Wang et al. 2007). Eine signifikante Erhöhung der TNF- α -mRNA wurde schon 1 h nach dem Beginn der Ischämie beobachtet. Der erste Spitzenwert des TNF- α -Proteins erscheint 2 – 6 h und der zweite Spitzenwert 24 – 36 h nach dem Beginn des ischämischen Insults (Hallenbeck et al. 2002).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen fanden wir auch eine erhöhte Produktion des Zytokins und eine starke Akkumulation von TNF- α -positiven Neuronen im frontoparietalen Kortex nahe des ischämischen Kerns. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Aktivierung der zerebralen PPAR- γ mit Pioglitazon sowohl die Expression von TNF- α als auch die Akkumulation von TNF- α -positiven Zellen in dem Randgebiet des ischämischen Kerns unterdrückt. Hosomi et al. (2005) haben berichtet, dass eine Senkung des TNF- α -Spiegels im ischämischen Gewebe mittels neutralisierender Antikörper eine Reduktion der Infarktgröße und des Infarktödems nach einer Ischämie bewirkt. TNF- α ist ein Aktivator von Mikroglia und ein potenter Induktor der Produktion von Adhäsionsmolekülen an den EC, welche die Anheftung und die Migration von Makrophagen und Leukozyten ins ischämische Gewebe fördern. Tatsächlich wurde eine verminderte Dichte der Entzündungszellen im ischämischen

Kortex bei mit Pioglitazon-behandelten Ratten beobachtet (Zhao et al. 2005). Die systemische Behandlung mit PPAR- γ -Agonisten vermindert die Expression von Adhäsionsmolekülen in EC (Luo et al. 2006, Sundararajan und Landreth 2004). Da in unseren Experimenten eine geringe Dosis von Pioglitazon icv infundiert wurde, gehen wir davon aus, dass Pioglitazon keinen direkten Effekt auf die Expression der Adhäsionsmoleküle in EC ausüben kann. Vielmehr scheint die verminderte Produktion und Freisetzung von TNF- α in beschädigten Neuronen bei den mit Pioglitazon-behandelten Ratten dafür verantwortlich zu sein, dass die EC in den umliegenden Gefäßen die Adhäsionsmoleküle nicht so stark exprimieren und folglich eine kleinere Anzahl von Entzündungszellen ins ischämische Gewebe übertritt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die starke Unterdrückung der TNF- α -Produktion durch die Aktivierung von zerebralen PPAR- γ die Expression von Entzündungsmediatoren und so die post-ischämische Inflammation hemmt und die Ausbreitung der neuronalen Schäden in der akuten Phase des Schlaganfalls vermindert.

4.5 Pioglitazon und IL-1 β nach einem ischämischen Schlaganfall

IL-1 β ist entscheidend an den Entzündungsreaktionen und dem neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie beteiligt. Die Antikörper gegen IL-1 β oder die Ausschaltung des IL-1 β -Gens bei IL-1 β -Knockout-Mäusen vermindern die exzitotoxischen Prozesse und den neuronalen Schaden im ischämischen Gewebe nach einem Schlaganfall (Allan und Rothwell, 2001, Allan et al. 2005). Die IL-1 β -mRNA ist schon innerhalb von 15 bis 30 min nach der MCAO deutlich erhöht und die Protein-Expression ist sowohl in der frühen aber auch in der späten Phase nach einer Ischämie gesteigert (Buttini et al. 1994, Wang et al. 2007). Auch wir haben zeigen können, dass der ischämische Schlaganfall zu einer starken Überexpression von IL-1 β und Anhäufung von IL-1 β -positiven Zellen im Randgebiet des Infarkts führt. Übereinstimmend mit bereits publizierten Daten befand sich IL-1 β vor allem in Mikrogliazellen/Makrophagen und nur in geringem Maße in Neuronen. Manche der IL-1 β -positiven Neurone wiesen Anzeichen apoptotischer Veränderungen auf. Die Gehirnischämie erhöht deutlich auch die Expression des membrangebundenen IL-1R1, welcher nach der Bindung des akzessorischen Proteins die Transkription zahlreicher inflammatorischer Zytokine und neurotoxischer Stoffe aktiviert (Glatz et al. 2010). Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, die Entzündungsreaktionen zu aktivieren und zu verstärken, welche hauptsächlich für die fortschreitenden Schäden verantwortlich sind. Der zweite IL-1 β

Rezeptor, IL-1R2 bindet zwar IL-1 β , jedoch ohne die Signaltransduktionswege im Zytoplasma zu aktivieren.

Es wurde bereits in einer früheren Studie gezeigt, dass eine systemische Behandlung mit dem PPAR- γ -Liganden Troglitazon zu einer Verringerung der IL-1 β -mRNA im ischämischen zerebralen Gewebe führt (Sundararajan et al. 2005). Diese Befunde konnten wir mit unseren Versuchen bestätigen, denn die icv Behandlung mit Pioglitazon verminderte ebenfalls das IL-1 β -Protein im ischämischen frontoparietalen Kortex sowohl 24 h als auch 48 h nach MCAO.

IL-1 β wird hauptsächlich in Mikrogliazellen/Makrophagen produziert. Durch Pioglitazon wird deren Anhäufung im ischämischen Gewebe vermindert (Zhao et al. 2005). Deshalb kann der verminderte Spiegel des Interleukin-Proteins durch die Senkung der Entzündungszellen erklärt werden. Außerdem wurde eine Reduktion des IL-1 β -Spiegels in den frühen Phasen (24 h) nach der MCAO beschrieben und zu späteren Zeitpunkten eine verminderte Akkumulation von Mikrogliazellen/Makrophagen beobachtet (Zhao et al. 2005). Deshalb postulieren wir, dass die niedrigere Expression und Freisetzung von IL-1 β im ischämischen Gewebe zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche führt und folglich auch die Migration von Makrophagen und Granulozyten unterdrückt. Andererseits kann der aktivierte PPAR- γ über so genannte Transrepression durch eine Interaktion zwischen dem PPAR- γ und anderen Transkriptionsfaktoren (wie dem NF- κ B) die Transkription von inflammatorischen Genen hemmen. Die Transkription dieser Gene wird durch Ko-Repressoren, welche an dem Promotor des Gens gebunden sind, verhindert. Unter Einwirkung von z.B. NF- κ B dissoziiert der Ko-Repressor vom Promotor und nach Bindung eines Ko-Aktivators kann die Transkription des Gens beginnen. Der aktivierte PPAR- γ bindet jedoch an den Ko-Repressor und verhindert dadurch dessen Dissoziation und die Bindung des Ko-Aktivators (Pascual et al. 2005). Obwohl diese Mechanismen in Makrophagen beschrieben wurden, gehen wir davon aus, dass der aktivierte PPAR- γ auch in der aktivierten Mikroglia über die gleichen Mechanismen die Produktion von IL-1 β und anderen inflammatorischen Zytokinen hemmen kann.

4.6 Pioglitazon und IL-6 nach einem ischämischen Schlaganfall

Neben TNF- α und IL-1 β gehört auch IL-6 zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren nach einem ischämischen Schlaganfall. Eine übermäßige Expression von IL-6 initiiert und verstärkt die Inflammation in den frühen Phasen nach dem ischämischen Insult und wirkt pro-

apoptotisch. In den späteren Phasen kann dieses Zytokin jedoch anti-apoptotisch und neuroprotektiv wirken (Rothwell 1999, Wang et al. 2007). Im Einklang mit früheren Untersuchungen zeigen auch unsere Ergebnisse, dass die zerebrale Ischämie die Produktion von IL-6 in Mikrogliazellen/Makrophagen im Randbereich des Infarktes im frontoparietalen Kortex erheblich erhöht. Tureyen et al. (2007) beschrieb erstmals die verminderte Konzentration der IL-6-mRNA 24 h nach der MCAO bei Ratten, die systemisch mit Rosiglitazon behandelt wurden. Wir haben in unserer Studie das IL-6-Protein gemessen. Dieses Protein spiegelt die IL-6 Expression genauer wieder. Die Kolokalisationsstudien zeigten deutlich, dass IL-6 sowohl in Mikrogliazellen/Makrophagen als auch in Neuronen exprimiert wird. In stark beschädigten, meistens apoptotischen Neuronen konnte die Expression von IL-6 und IL-1 β nachgewiesen werden.

Die Überexpression von IL-6 kann zu einer übermäßigen Inflammation führen. Nach der Bindung an seinen Rezeptor aktiviert IL-6 u. a. den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt die Transphosphorylation der Rezeptor-vermittelten JAKs und der STATs. Daraufhin bewegen sich die STATs zum Zellkern, wo sie die Transkription von inflammatorischen Genen initiieren (van Wagoner und Benveniste 1999). Es wurde berichtet, dass die Inhibition der Phosphorylierung von JAK/STAT-3 das Infarktvolumen nach einer fokalen zerebralen Ischämie reduzierte und den neurologischen Status verbesserte (Satriotomo et al. 2006). Die molekularen Mechanismen der IL-6-Inhibition durch Pioglitazon sind nicht aufgeklärt. Einer der Mechanismen kann die Transrepression sein (wie bereits unter 4.5 beschrieben). Andererseits kann auch die negative Autoregulation von CCAAT/Enhancer-Bindungsproteinen durch die Transaktivierung von PPAR- γ eine Rolle spielen. Diese Proteine erhöhen die Transkription von zahlreichen inflammatorischen Mediatoren wie IL-6. In Gefäßmuskelzellen inhibieren die Agonisten am PPAR- γ die Bindung des Komplexes vom NF- κ B und CCAAT/Enhancer-Bindungsprotein an die DNA (Takata et al. 2002). Ob die gleichen Mechanismen auch für die Pioglitazon-induzierte Hemmung der IL-6-Expression verantwortlich sind, muss in nach-folgenden Untersuchungen geklärt werden. Wir gehen davon aus, dass die Inhibition der übermäßigen IL-6-Produktion in den ersten Stunden nach dem Schlaganfall die neuronale Schädigung vermindert und so zu besseren neurologischen Ergebnissen nach der Ischämie beiträgt.

IL-6 hat auch anti-apoptotische und neurotrophe Effekte und kann nach einem ischämischen Schlaganfall vor Neurotoxizität schützen. (Sharma und Kumar 1998, Rothwell 1999, Wang et al. 2007). Interessanterweise werden die gleichen Mechanismen, welche zur Gehirnschädigung und zum neuronalen Tod nach einem Schlaganfall beitragen, wie z. B. die

Aktivierung des JAK/STAT-Signalübertragungsweges, auch für die neuroprotektiven Effekte verantwortlich gemacht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Blockade von IL-6 die Phosphorylierung von STAT-3-Proteinen reduziert, die Apoptoserate erhöht und den neuronalen Schaden verschlimmert. Daraus ließ sich schließen, dass die Aktivierung vom STAT-3-Proteinen den neuronalen Tod verhindern kann (Yamashita et al. 2005). Außerdem verhindert eine Überexpression von IL-6 die NMDA-induzierte Exzitotoxizität (Ali et al. 2000).

Wir zeigen in dieser Arbeit, dass Pioglitazon die erhöhte Produktion von IL-6 zu späteren Zeitpunkten nach MCAO nicht mehr hemmt. In dieser Phase könnte IL-6 sogar neuroprotektiv und neuroregenerativ wirken. Wir postulieren, dass eine sehr präzise Regulation der IL-6-Expression im ischämischen Gewebe in verschiedenen Phasen nach einem Schlaganfall entscheidend zu den neuroprotektiven Effekten der aktivierten zentralen PPAR- γ beiträgt.

Unsere Daten weisen zusammen mit bisherigen Forschungsergebnissen, wie z.B. der Senkung der Akkumulation von den Mikrogliazellen/Makrophagen und der verminderten COX-2-Produktion deutlich auf die Bedeutung von zentralen PPAR- γ und deren anti-entzündlichen Wirkungen, sowie auf die Effekte der PPAR- γ -Liganden im ischämischen Hirngewebe im Hinblick auf die Neuroprotektion hin. Die beobachtete Verminderung der Infarktgröße und der sensorischen Ausfälle bei den Ratten, die mit Pioglitazon behandelt wurden, bestätigt diese Hypothese. Pioglitazon kann somit wichtige therapeutische Funktionen bei der Behandlung von ischämischen Schlaganfällen haben. Blanco et al. (2005), berichteten, dass Patienten, die an einem atherothrombotischen ischämischen Schlaganfall litten und bei denen ein erhöhter Plasmaspiegel des endogenen PPAR- γ -Liganden 15-d-PGJ₂ festgestellt wurde, einen besseren neurologischen Status und kleinere Infarktgrößen aufwiesen (sowohl 24 h als auch 48 h nach MCAO). In einer klinischen Studie wurde berichtet, dass es zu einer verbesserten Erholungsphase von Schlaganfallpatienten gekommen ist, die an Diabetes Typ 2 erkrankt waren und mit Pioglitazon/Rosiglitazon behandelt wurden (Lee und Reding 2007).

Unsere Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass die TZDs durch die Aktivierung der zerebralen PPAR- γ die post-ischämische Inflammation hemmen und eine Reduktion der neuronalen Schäden nach einem ischämischen Schlaganfall bewirken und somit neuroprotektive Effekte aufweisen.

5 Zusammenfassung

Die systemische oder zentrale Behandlung von Versuchstieren mit den selektiven Agonisten von PPAR- γ , den Thiazolidinedionen (wie dem Pioglitazon), reduziert nach einem ischämischen Schlaganfall die Infarktgröße und verbessert den neurologischen Status. Die entscheidende Rolle könnte dabei eine Unterdrückung der post-ischämischen Inflammation spielen. Die zerebrale Ischämie aktiviert die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren, zu welchen auch TNF- α , IL-1 β und IL-6 gehören, und führt zur Migration von Granulozyten und Makrophagen in das ischämische Gewebe. Diese Zellen bewirken zusammen mit den aktivierten Mikrogliazellen eine starke post-ischämische Inflammation, die entscheidend zum Verlust der beschädigten Neurone in der Penumbra beiträgt. Der PPAR- γ wird im Gehirn konstitutiv exprimiert und der Schlaganfall steigert erheblich die Synthese des Rezeptors im ischämischen Gehirngewebe. Die Thiazolidinedione überwinden die Blut-Hirn-Schranke. Deshalb können bei einer systemischen Behandlung mit den PPAR- γ -Agonisten sowohl die peripheren als auch die zentralen Effekte zu dem verbesserten Ausgang nach einer zerebralen Ischämie beitragen. Um die Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung der zentralen PPAR- γ zu untersuchen, wurde Pioglitazon ununterbrochen fünf Tage vor und ein bzw. zwei Tage nach MCAO intrazerebroventrikulär infundiert, um eine selektive Stimulation der PPAR- γ im Gehirngewebe zu erreichen.

Pioglitazon reduzierte das Infarktvolumen und verminderte signifikant den Grad der sensorischen Ausfälle 48 h nach MCAO. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Pioglitazon die Entwicklung von motorischen und sensorischen Defiziten nach einem Schlaganfall unterschiedlich beeinflussen kann. Wie erwartet, wurde die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 an beiden Tagen nach dem Schlaganfall im Randgebiet der Ischämie erheblich erhöht. TNF- α wurde fast ausschließlich in Neuronen und IL-1 β in Mikrogliazellen/Makrophagen exprimiert. Hauptsächlich wurde IL-6 24 h nach dem ischämischen Insult in Mikrogliazellen/Makrophagen aber auch in manchen Neuronen synthetisiert. In stark beschädigten Neuronen konnte die Expression von beiden Zytokinen IL-6 und IL-1 β nachgewiesen werden. Die Aktivierung der zerebralen PPAR- γ mit Pioglitazon verminderte sowohl die Überexpression von TNF- α und IL-1 β als auch die Akkumulation von TNF- α - und IL-1 β -positiven Zellen in dem Randgebiet des ischämischen Kerns an beiden Tagen nach MCAO. Interessanterweise hemmte Pioglitazon die IL-6-Produktion nur in den ersten 24 h nach dem Schlaganfall, wenn eine übermäßige Expression des Zytokins die Entzündungsreaktionen initiiert und verstärkt,

nicht aber in der späteren Phase, wenn IL-6 neuroprotektiv wirken und den neuronalen Tod verhindern kann.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Aktivierung der zentralen PPAR- γ die post-ischämische Entzündung hemmt, den Gehirnschaden begrenzt und die Restitution nach einem Schlaganfall verbessern kann. Darüber hinaus tragen diese Ergebnisse wesentlich zum besseren Verständnis der Bedeutung der zentralen PPAR- γ bei pathophysiologischen Prozessen im ischämischen Gewebe bei und können deshalb als ein wichtiger Beitrag zur Etablierung von PPAR- γ -Agonisten, wie z.B. Pioglitazon als neues Therapiekonzept zur Behandlung ischämischer Schlaganfälle betrachtet werden.

6 Referenzen/Literatur

- Ali, C., Nicole, O., Docagne, S., Lesne, S., MacKenzie, E.T., Nouvelot, A., Buisson, A., Vivien, D. (2000): Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 20: 956-966
- Allan, S. M. und Rothwell, N. J. (2001): Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 734-744
- Allan, S. M., Tyrrel, P. J., Rothwell, N. J. (2005): Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 629-640
- Barone, F.C., Arbin, B., White, R.F., Miller, A., Webb, C. L., Willette, R. N., Lysko, P.G., Feuerstein G.Z. (1997): Tumor necrosis factor- α : a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28: 1233-1244
- Beamer, N.B., Coull, B.M., Clark, W.M., Hazel, J.S., Silberberger, J.R. (1995): Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann. Neurol.*, 37: 800-805
- Blanco, M., Moro, M. A., Davlos, A., Leira, R., Castellanos, M., Serena, J., Vivancos, J., Rodriguez-Yanez, M., Lizasoain, I., Castillo, J. (2005): Increased plasma levels of 15- desoxy Delta prostaglandin J₂ are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke*, 36: 1189-1194
- Buttini, M., Sauter, A., Boddeke, H. W. (1994): Induction of interleukin-1 β mRNA after focal cerebral ischemia in the rat. *Mol. Brain Res.*, 23: 126-134
- Choi, D. W. (1996): Ischemia-induced apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6: 667-672
- Desvergne, B., Wahli, W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20: 649-688
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, 22: 391-397
- Dobrian, A. D., Schriver, S. D., Khraibi, A. A., Prewitt, R. L. (2004): Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension*, 43: 48-56

Feuerstein, G. Z., Liu, T., Barone, F. C. (1994): Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor- α . *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 6: 341-360.

Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.-F., Hu, X. J. (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 26: 627-634

Glatz, T., Stöck, I., Nguyen-Ngoc, M., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J. und Zhao, Y. (2010): Peroxisome-proliferator-activated receptors γ and peroxisome-proliferator-activated receptors β/δ and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain. *J. Hypertension*, 28: 1488-1497

Hamann, G.F. (1997): Acute cerebral infarction: pathophysiology and modern treatment concepts. *Radiologe*, 37(11): 843-52

Hallenbeck, J. M. et al. (2002): The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat. Med.*, 8: 1363 - 1368

Hosomi, N., Ban, C.R., Naya, T., Takahashi, T., Guo, P., Song, X. R., Kohno, M. (2005): Tumor necrosis factor- α neutralisation reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 25: 959-967

Iadecola, C., Alexander, M. (2001): Cerebral ischemia and inflammation. *Curr. Opin. Neurol.*, 14: 89-94

Kim, J. S. (1996): Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J. Neurol. Sci.*, 3: 69-78

Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., Choi, D. W. (2000): Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.*, 106: 723-731

Lee, J. und Reding, M. (2007): Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists on central nervous system inflammation. *J. Neurosci. Res.*, 71: 315-325

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) *J. Biol. Chem.*, 270: 12953-12956

- Lin, T.-N., Cheung, W.-M., Wu, J.-S., Chen, J.-J., Lin, H., Liou, J.-Y., Shyue, S.-K., Wu, K.-K. (2006): 15d-prostaglandin J₂ protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Tromb. Vasc. Biol.*, 26: 481-487
- Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C., Feuerstein, G. Z. (1994): Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25: 1481-1488
- Lou, H.C., Edvinsson, L., MacKenzie, E. T. (2004): The concept of coupling blood flow to brain function: Revision required? *Neurolog. Progress*, 3: 289-297
- Luo, Y., Yin, W., Signore, A. P., Zhang, F., Hong, Z., Wang, S., Graham, S. H., Chen, J. (2006): Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferators-activated receptor- γ agonist rosiglitazone. *J. Neurochem.*, 97: 435-448
- Mabuchi, T., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Yanagihara, T., Hori, M., Matsumoto, M. (2000): Contribution of Microglia/Macrophages to Expansion of Infarction and Response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 31: 1735-1743
- Maeshiba, Y., Kiyota, Y., Yamashita, K., Yoshimura, Y., Motohashi, M., Tanayama, S. (1997): Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs and monkeys. *Arzneimittelforschung*, 47: 29-35
- Mattson, D. L. and Wu, F. (2000): Nitric Oxide Synthase Activity and Isoforms in Rat Renal Vasculature. *Hypertension*, 35: 337-341
- McAuley, M. A. (1995): Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 7: 153–180
- Nawashiro, H., Martin, D., Hallenbeck, J.M. (1997): Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb. Blood Flow Netab.*, 17: 229-232
- Ou, Z., Zhao, S., Labiche, L. A., Strong, R., Grotta, J. C., Hermann, O., Aronowski, J., (2006): Neuronal expression of peroxisome proliferator- activated receptor- gamma (PPAR γ) and 15d-prostaglandin J₂- mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain Res.*, 1096: 196-203
- Pantoni, L., Sarti, C., Inzitari, D. (1998): Cytokines and cell adhesion molecule in cerebral ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18: 503-513.

- Pascual, G., Amy L. Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C. K. (2005): a SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*, 437: 759-763
- Patzer, A., Zhao, Y., Stöck, I., Gohlke, P., Herdegen, T. and Culman, J. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.*, 9:1786-1794
- Paxinos, G. und Watson, C. (1986): *The rat brain*. San Diego: Academic.
- Ricote, M., Huang, J.T., Welch, J.S. and Glass, C.K. (1999): The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J. Leukocyte Biology*, 5: 733-739
- Ricote, M. und Glass, C.K., (2007): PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Molecular and Cell Biology of Lipids.*, 8: 926-935
- Rothwell, N., Allan, S., Toulmond, S. (1997): The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J. Clin. Invest.*, 100: 2648-2652
- Rothwell, N. J. (1999): Cytokines – killers in the brain? *J. Physiol.*, 514 (1): 3-17
- Rothwell, N.J. und Luheshi, G.N., (2000): Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.*, 23: 618-625.
- Roux-Lombard, P. (1998): The interleukin-1 family. *Eur. Cytokine New*, 9: 565-576
- Sasaki, M., Jordan, P., Welbourne, T., Minagar, A., Joh, T., Itoh, M., Elrod, J. W., Alexander J. S. (2005): Troglitazone, a PPAR- γ activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF- α . *BMC Physiol.*, 5: 3
- Satriotomo, I., Bowen, K., Vemuganti, R. (2006): JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, 98: 1353-1386
- Sharma, B. K. und Kumar, K. (1998): Role of inflammatory cytokines in cerebral ischemia: a review. *Metab. Brain Dis.*, 13: 1-8

- Sundararajan, S., Gamboa, J. L., Victor, N. A., Wanderi, E. W., Lust, W. D., Landreth, G. E. (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience*, 130: 685-696
- Sundararajan, S., Landreth, G. E. (2004): Antiinflammatory properties of PPARgamma agonists following ischemia. *Drug News Perspect.*, 17: 229-236
- Swanson, R. A., Morton, M. T., Tsao-Wu, G., Savalos, R. A., Davidson, C., Sharp, F. R. (1989): A semi-automated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb Blood Flow Metab.*, 10: 290-293
- Takata et al., (2002): Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between CCAAT/enhancer-binding protein- δ and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circ. Res.*, 91: 427-433.
- Tureyen, K., Kapadia, R., Bowen, K. K., Satriotomo, I., Liang, J., Feinstein, D. L., Vemuganti, F. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J. Neurochem.*, 101: 41-56
- Van Wagoner, N. J. and Benveniste, E. N. (1999): Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.*, 100: 124-139
- Wang, X., Yue, T.L., Barone, F.C., White, R.F., Gagnon, R.C., Feuerstein, G.Z. (1994): Concomitant cortical expression of TNF- α and IL-1 β mRNA follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 23: 103-114
- Wang, Q., Tang, X. N., Yenari, M. A. (2007): The inflammatory response to stroke. *J. Neuroimmunol.*, 84: 53-68
- Yamashita, T., Sawamoto, L., Suzuki, S., Suzuki, N., Adachi, K., Kawase, T., Mihara, M., Ohsugi, Y., Abe, K., Okano, H. (2005): Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J. Neurochem.*, 94: 459-468
- Zhao, Y., Patzer, A., Gohlke, p., Herdegen, T., Culman, J. (2005): The intracerebral application of the PPAR- γ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 278-282

Zhao, Y., Patzer, A., Herdegen, T., Gohlke, P., Culman, J. (2006): Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *Faseb J.*, 20: 1162-1175

7 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich vor allem bei meinen Doktorvater PD Dr. med. Juraj Culman für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit, für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ideen.

Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit hat auch Frau Dr. Yi Zhao, die mich hervorragend bei der Einarbeitung in die Labortechnik betreute und mir mit ihren Erfahrungen immer kompetent zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie bedanken, wobei ich da Frau Britta Schwarten und Herrn Jan Brdon besonders hervorheben möchte und von meinen Mitdoktoranden möchte ich mich vor allem bei Andreas Patzer bedanken, die mich in die Experimente der Schlaganfalldurchführung sorgfältig eingewiesen haben.

Ganz besonders danke ich natürlich auch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre, sowie meinem Lebensgefährten, der meinem Studium und meiner Doktorarbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Ivonne Stöck

Wohnort: Ursinusweg 1, 24159 Kiel

Geburtsdatum: 12.12.1978

Geburtsort: Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Ingo Stöck, geb. 02.11.1949
Ingrid Stöck, geb. 28.08.1949

Geschwister: Sebastian Stöck, geb. 08.03.1985

AUSBILDUNGSDATEN:

Schulbildung: 1985 - 1990 Oskar-Heinroth-Grundschule in Berlin
1990 - 1997 Gymnasium Altenholz
1998 - 1999 Integrierte Gesamtschule Friedrichsort

Schulabschluss: Abitur

Ausbildung: 1999 – 2001 abgeschlossene Ausbildung zur Zahnarzthelferin (Praxis Dr. Hohenwald und Schneeberg in Kiel)

Studium: 01.04.2001 - 09.12.2006 abgeschlossenes Zahnmedizinstudium (Christian-Albrechts-Universität in Kiel)
Dissertation unter der Leitung von PD Dr. Juraj Culman am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Kiel

Assistenzzeit: 01.04.2007 - 14.11.2008 in der Praxis Dres. Nentwig in Kiel
15.11.2008 - 31.03.2009 in der Praxis Dr. Engelsmann und Herr Bünning in Molfsee

BERUFLICHE ERFAHRUNGEN:

Angestellte Zahnärztin: seit 31.03.2009 in der Praxis von Dr. Engelsmann und Herrn Bünning in Molfsee

Kiel, den _____

Ivonne Stöck

9 Publikationen

Patzer, A., Zhao Y., **Stöck, I.**, Gohlke, P., Herdegen, T. and Culman, J. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia.

European Journal of Neuroscience. 9: 1786-1794

Glatz, T., **Stöck, I.**, Nguyen-Ngoc, M., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J. und Zhao, Y. (2010): Peroxisome-proliferator-activated receptors γ and peroxisome-proliferator-activated receptors β/δ and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain. Journal of Hypertension. 28:1488-1497